

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE VETERINARIA**

**Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los  
Alimentos**



**TESIS DOCTORAL**

**Aplicación de técnicas de PCR en tiempo real a la trazabilidad y  
autenticidad de los piensos**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

**Nicolette Pegels Rojas**

Directores

**Isabel González Alonso  
Teresa García Lacarra  
Rosario Martín de Santos**

**Madrid, 2016**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE VETERINARIA**

**DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN, BROMATOLOGÍA Y**

**TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS**



**APLICACIÓN DE TÉCNICAS DE PCR EN TIEMPO REAL A LA  
TRAZABILIDAD Y AUTENTICIDAD DE LOS PIENSOS**

**TESIS DOCTORAL**

**NICOLETTE PEGELS ROJAS**

**Madrid, 2015**





**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE VETERINARIA**

**DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN, BROMATOLOGÍA Y**

**TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS**



**APLICACIÓN DE TÉCNICAS DE PCR EN TIEMPO REAL A LA  
TRAZABILIDAD Y AUTENTICIDAD DE LOS PIENSOS**

**TESIS DOCTORAL**

Memoria que, para optar al título de  
Doctor con mención honorífica de  
“Doctorado Europeo”, presenta la  
Licenciada Nicolette Pegels Rojas  
Madrid, 2015





**DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN, BROMATOLOGÍA Y TECNOLOGÍA  
DE LOS ALIMENTOS**  
**FACULTAD DE VETERINARIA**

Ciudad Universitaria , s/n. 28040 Madrid

Teléfono: 91 3943751. Fax: 91 3943743

**M<sup>a</sup> ISABEL GONZÁLEZ ALONSO (*Profesora Titular de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos*), TERESA GARCÍA LACARRA (*Profesora Titular de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos*) y M<sup>a</sup> DEL ROSARIO MARTÍN DE SANTOS (*Catedrática de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos*),**

**CERTIFICAN:**

Que la Tesis Doctoral titulada “Aplicación de técnicas de PCR en tiempo real a la trazabilidad y autenticidad de los piensos”, de la que es autora la Licenciada en Ciencia y Tecnología de los Alimentos Dña. Nicolette Pegels Rojas, ha sido realizada en el Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid, bajo la dirección conjunta de las que suscriben, y cumple las condiciones exigidas para optar al título de Doctor con mención honorífica de “Doctorado Europeo”.

Madrid, 23 de julio de 2015

Fdo: M<sup>a</sup> Isabel González Alonso

Fdo: Teresa García Lacarra

Fdo: M<sup>a</sup> Rosario Martín de Santos



*A mis padres Lorena y Ulrich*

*A Markus*

*A Edu*



## **AGRADECIMIENTOS**

*Quisiera dar las gracias a todas las personas que, de una manera u otra, me han ofrecido su ayuda desinteresada durante la realización de esta Tesis Doctoral.*

*En primer lugar quisiera mostrar mi más sincero agradecimiento a mis directoras de Tesis, Rosario Martín de Santos, Isabel González Alonso y Teresa García Lacarra. Charo, gracias por el apoyo y la confianza depositada en mí durante estos años, por haber creído en mí, incluso cuando ni yo lo hacía. Gracias por tu entusiasmo, por enseñarme a no conformarme y a perseguir la excelencia. Tus consejos y críticas siempre me ayudaron a seguir esforzándome para sacar lo mejor de mí, gracias. Isabel, muchas gracias por tu paciencia y ayuda, sin tu trabajo y apoyo constante la realización de esta Tesis no hubiera sido posible. Gracias por ser una gran persona, valoro mucho tu ayuda, siempre amable y con una sonrisa. Teresa, gracias por tus muestras de interés y apoyo, siempre que he necesitado tu ayuda has dejado lo que estabas haciendo para escucharme y ofrecerme una solución. A las tres gracias por darme la oportunidad de participar en el apasionante mundo de la ciencia y la investigación.*

*Al Ministerio de Educación y Ciencia por la asignación del Proyecto AGL 2007-60077 y a la Comunidad Autónoma de Madrid por la concesión del contrato de personal investigador de apoyo. Asimismo, agradecer al Ministerio de Educación y Ciencia por la beca recibida dentro del Plan de Formación de Profesorado Universitario.*

*A Lorenzo de la Hoz Perales (†), Director del Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid cuando empecé mi Tesis Doctoral, por darme la oportunidad de realizarla en este Departamento, y a la actual Directora, M<sup>a</sup> Dolores Selgas Cortecero, por la amabilidad y atención mostradas.*

*Mi más sincero agradecimiento a todos los profesores y personal del Departamento por su acogida y generosidad. Gracias a Pablo por su cercanía y por las agradables charlas compartidas por los pasillos. A Juan Miguel por su buen humor y disposición para ayudar. A Fernanda, María, Paloma y Ana por su amabilidad y apoyo.*

*Agradezco de forma especial a mis compañeros de laboratorio, quienes me regalaron su amistad de forma sincera y me ayudaron a seguir adelante en esta experiencia cuando las murallas parecían infranqueables. Solo compartir estos años con vosotros ha hecho que esta Tesis merezca la pena. Agradecer en primer lugar a mis compañeros de grupo de investigación. A María, mi compañera y amiga, aún recuerdo como si fuera ayer mis primeros días en el lab, cual Maestra Jedi me enseñaste a adquirir experiencia en este complicado mundo, ofreciéndome tu amistad desde el primer momento... ha pasado mucho tiempo desde entonces (¡ya eres hasta mami!), y me alegro de contar con una amiga como tú. Miguel Ángel, qué puedo decir del navalucillense número 1... son tantos los momentos que hemos vivido juntos que me faltan las palabras para expresarte mi gratitud. Infinitas gracias por ser como eres, por tu complicidad y ánimos constantes, y por las risas y carcajadas que me has regalado a lo largo de estos años. A Violeta e Irene, habéis sido excelentes compañeras a pesar de no haber*



*coincido juntas en el laboratorio. Violeta, gracias por tus ánimos y generosidad, te mereces un montón de cosas buenas. Irene, muchas gracias por el tiempo que me dedicaste en los primeros meses cuando te abordaba con infinidad de dudas, no solo me ofreciste tu ayuda sino también tu amistad, muchas gracias. Inés, eres una gran persona y lo que dijese aquí se quedaría corto... gracias por traer la alegría al lab, por las horas de charlas, las carcajadas, y por supuesto, por ser la embajadora de USA en el lab. Siempre te recordaré con tu sonrisa y pronunciando esa gran frase "ok bye bye". Silvia, gracias por tu simpatía, por escucharme, y por comprenderme, tus ánimos han sido indispensables para poder finalizar la Tesis. A las últimas incorporaciones del grupo, Raquel y Aina.*

*A Almudena y Eugenia, por ser excelentes personas y profesionales, ambas sois un ejemplo de lucha y superación. A Alicia por ser simplemente genial, cuántas tardes de confidencias y risas hemos vivido, gracias por todos esos momentos. Al grupo "punto lab": Juan, Loreto, Juanjo, Cristina, Estefanía, Carlos y Sara. Juanjo, gracias por hacer del lab un lugar más alegre, y en especial, por hacer más llevaderas las tardes infinitas. Loreto, de una isleña a otra... te agradezco tu enorme compañerismo, siempre atenta y dispuesta a animarnos con alguna de tus historias. Cristina, gracias por ser como eres, me has ayudado mucho con tus palabras de ánimo, tu sonrisa y tu actitud positiva frente a las adversidades, no cambies porque eres una persona excelente. Estefanía y Carlos, valéis mucho y estoy convencida de que llegareis muy lejos, sois unos grandes profesionales y mejores personas, me alegro de haber compartido todo este tiempo con vosotros. Sara, muchas gracias por tus ánimos y apoyo durante el tiempo que hemos compartido en el laboratorio. Al grupo de Juan Miguel: Esther, Rebeca, Marta, Virginia, Nivia, Susana, Irene E., Laura y Javi, muchas gracias por vuestra simpatía y compañerismo.*

*Thanks to Dr. Gilbert Berben (Département Valorisation des Productions, Authentification et Traçabilité, Centre Wallon de Recherches Agronomiques, Gembloux, Belgium) for hosting me in the laboratory and for his brilliant ideas, invaluable help and kindness. I wish to express my sincere gratitude to Dr. Olivier Fumière for his great human quality, thanks for your kind and enthusiastic supervision during the research work developed, which I learned and enjoyed so much. Also, thanks to all the lab technicians, PhD students and researchers that I met in Belgium, especially to F. Debode, E. Janssen, J. Maljean, A. Marien and P. Veys. You all made me feel at home even though Belgium is very different from Spain, remarkably in winter! I had a lovely experience during the time I spent with you, I'll never forget. "Je vous remercie beaucoup". Last but not least, special thanks to my Bulgarian fellow, Yordan, you are great!*

*Naturalmente, no podía faltar un apartado en estos agradecimientos a todas las personas que habéis estado conmigo todos estos años, gracias por vuestro interés desinteresado por siempre darme más de lo que os he pedido. A las chicas más "fantásticas" de Madrid: Ire, Lore y María, habéis hecho que Madrid sea mi hogar y vosotras mi familia. Gracias por ser tan especiales, siempre conseguimos acabar el día con risas y carcajadas, a pesar de que a veces parezca imposible. A mis amigas que me han visto crecer: Grima, Naya, Noe y Ro, gracias por todos estos años. Agradecer a las "anfitrions" por ser únicas... poco les puedo decir que no sepan, gracias por tantos momentos inolvidables, ¡y los que nos quedan!*

*A mis padres y hermano, gracias a ellos he podido alcanzar esta meta. A mi padre, por ser un ejemplo a seguir, por ayudarme y saber dar siempre con las palabras más adecuadas para animarme y continuar cargada de positivismo. A mi madre, por su dedicación a la familia y no fallarme nunca, gracias por ser mi mejor amiga. A Markus por su enorme interés en esta Tesis, gracias por tu apoyo incondicional, fundamental en los momentos más difíciles. A mi familia, en especial a mis abuelos, ejemplos de coraje y valentía, muchas gracias. Agradecer también a la familia de Edu, en especial a Manoli, Eduardo, María, Jaime, Pepita y Niva, por su cariño.*

*A Edu, gracias por ser como eres, por ser generoso, divertido, amable, inteligente, ¡guapísimo! Te admiro, no tengo palabras para expresar lo afortunada que me siento de tenerte a mi lado. Gracias por cuidar de mí todo este tiempo.*

*A todas las personas que no aparecen en estas líneas y debo mucho, GRACIAS.*



# *Índice*





<b>RESUMEN</b> .....	<b>1</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>5</b>
<b>I. EXPOSICIÓN GENERAL DEL PROBLEMA A INVESTIGAR</b> .....	<b>7</b>
<b>II. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>13</b>
II.1. PRODUCCIÓN Y COMERCIALIZACIÓN DE PIENSOS .....	15
II.2. TRAZABILIDAD Y AUTENTICIDAD DE MATERIAS PRIMAS Y PIENSOS .....	26
II.2.1. LEGISLACIÓN APLICABLE .....	26
II.2.2. TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA DETERMINAR EL ORIGEN DE LOS PIENSOS .....	35
II.2.2.1. MICROSCOPIA ÓPTICA .....	35
II.2.2.2. TÉCNICAS ESPECTROMÉTRICAS .....	38
II.2.2.2.1. Espectroscopia de infrarrojo cercano (NIRS) .....	38
II.2.2.2.2. Microscopía-NIRS (NIRM) .....	42
II.2.2.2.3. NIR-imagen (NIR-CI) .....	45
II.2.2.2.4. Espectrometría de masas (MS) .....	46
II.2.2.3. TÉCNICAS INMUNOLÓGICAS .....	50
II.2.2.4. TÉCNICAS GENÉTICAS .....	52
II.2.2.4.1. PCR convencional .....	53
II.2.2.4.2. PCR en tiempo real .....	55
II.2.2.4.3. Microarrays de ADN .....	64
II.2.2.4.4. Técnicas de secuenciación masiva. Pirosecuenciación .....	65
<b>III. RESULTS AND DISCUSSION</b> .....	<b>69</b>
III.1. DETECTION OF ANIMAL INGREDIENTS IN FEEDS BY REAL TIME PCR TECHNIQUES (Published articles) .....	71
III.1.1. RUMINANTS .....	71
III.1.2. MONOGASTRICS .....	91
III.1.3. FISH .....	125
III.1.4. OTHER ANIMAL SPECIES .....	137
III.2. IDENTIFICATION OF EPIGENETIC MARKERS BASED ON DNA METHYLATION FOR DETERMINING THE TISSUE ORIGIN OF FEED INGREDIENTS (Predoctoral stay at the European Union Reference Laboratory for Animal Proteins in feedingstuffs, EURL-AP, Belgium) .....	159

<b>IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>175</b>
IV.1. DETECCIÓN DE INGREDIENTES DE ORIGEN ANIMAL EN PIENSOS MEDIANTE TÉCNICAS DE PCR EN TIEMPO REAL	177
IV.1.1. DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE SISTEMAS DE PCR EN TIEMPO REAL	179
IV.1.2. APLICACIÓN DE TÉCNICAS DE PCR EN TIEMPO REAL AL CONTROL DE AUTENTICIDAD DE PIENSOS	187
IV.1.2.1. Vaca, oveja, cabra y grupo rumiante	187
IV.1.2.2. Cerdo y aves	192
IV.1.2.3. Especies de pescado	200
IV.1.2.4. Otras especies animales	203
IV.1.2.5. Análisis de alimentos para animales de compañía	206
IV.2. IDENTIFICACIÓN DE MARCADORES EPIGENÉTICOS DE METILACIÓN DEL ADN ESPECÍFICOS DE TEJIDO PARA LA DIFERENCIACIÓN DE INGREDIENTES ANIMALES EN PIENSOS (Estancia predoctoral en el Laboratorio Comunitario de Referencia para las Proteínas Animales en los piensos, EURL-AP, Bélgica)	212
<b>V. CONCLUSIONES</b>	<b>217</b>
<b>V. CONCLUSIONS</b>	<b>221</b>
<b>VI. TRABAJO FUTURO</b>	<b>223</b>
<b>VII. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>229</b>
<b>VIII. GLOSARIO DE ABREVIATURAS</b>	<b>259</b>

**“Perhaps science does not develop by the accumulation of individual discoveries and inventions”**

Thomas Kuhn

**“True ignorance is not the absence of knowledge, but the refusal to acquire it”**

Karl Popper

**“A journey of a thousand miles begins with a single step”**

Lao Tzu





# *Resumen*

# *Abstract*





La trazabilidad y el correcto etiquetado de los piensos y sus ingredientes son factores esenciales para prevenir fraudes y garantizar la seguridad alimentaria. En el ámbito de la lucha contra las Encefalopatías Espongiformes Transmisibles (EETs), la prohibición de la Unión Europea (UE) de alimentar a rumiantes y otros animales de granja con harinas de carne y huesos derivadas de animales, hace necesaria la disponibilidad de metodologías que permitan identificar el origen de las materias primas e ingredientes presentes en los piensos. El método oficial de análisis microscópico tradicionalmente empleado para este fin presenta limitaciones a la hora de diferenciar entre los huesos de mamíferos y de aves, así como para determinar el origen animal específico de las partículas detectadas. Por ello, una de las prioridades de la UE en los últimos años ha sido potenciar la búsqueda y desarrollo de técnicas analíticas alternativas que permitan la detección específica de todos los componentes que integran los piensos. Teniendo en cuenta estos aspectos, en esta Tesis Doctoral se han desarrollado técnicas de PCR en tiempo real con sondas TaqMan® para el control de autenticidad y trazabilidad de ingredientes de origen animal utilizados en la fabricación de los piensos. Las especies objeto de este trabajo han sido: vaca (*Bos taurus*), oveja (*Ovis aries*), cabra (*Capra hircus*), grupo rumiante, cerdo (*Sus scrofa*), pollo (*Gallus gallus*), pavo (*Meleagris gallopavo*), pato (*Anas platyrhynchos* x *Cairina moschata*), oca (*Anser anser*), grupo aviar, caballo (*Equus caballus*), conejo (*Oryctolagus cuniculus*), liebre (*Lepus capensis*), grupo lepórido (conejo y liebre) y pescados.

En primer lugar, se seleccionaron secuencias nucleotídicas mitocondriales (región polimórfica D-loop y genes 12S y 16S ARNr) y se diseñaron parejas de cebadores específicos para la amplificación selectiva de fragmentos de ADN de pequeño tamaño (entre 62 y 118 pb) en todas las especies diana. Asimismo, se diseñaron sondas tipo TaqMan® en zonas internas a las secuencias de ADN delimitadas por cada pareja de cebadores. Todos los sistemas (cebadores/sonda) de PCR en tiempo real desarrollados permitieron la detección específica de la correspondiente especie o grupo de especies diana, no generando señal positiva de amplificación en un amplio número de especies animales y vegetales heterólogas.

Una vez comprobados los parámetros analíticos necesarios para la validación de las técnicas de PCR en tiempo real desarrolladas (eficiencia de amplificación, linealidad, sensibilidad, veracidad y precisión), se evaluó su aplicabilidad en el análisis de muestras reales de piensos destinados a animales de abasto. Para ello, se analizó una amplia variedad de piensos industriales elaborados por el Laboratorio Comunitario de Referencia para las Proteínas Animales en los piensos (EURL-AP, Bélgica) y el *Co-operative Central Laboratory* (CCL-NutriControl, Holanda), atendiendo a las condiciones de procesamiento establecidas por la legislación europea. Los piensos contenían concentraciones crecientes (de 0,1 a 100 %) de proteínas animales transformadas de origen rumiante y no rumiante, procedentes de distintos tejidos animales y tratadas a diferentes temperaturas (125, 133, 141, 145 y 159 °C) durante 20 minutos a presión hiperbárica.

Los resultados obtenidos revelaron que a medida que aumentaba la temperatura de tratamiento se registraban valores de fluorescencia más tardíos, limitando la sensibilidad de los ensayos en aquellos piensos que contenían las concentraciones más bajas de proteínas animales transformadas, y sometidas a los tratamientos térmicos más extremos. No obstante, las técnicas de PCR en tiempo real desarrolladas demostraron su capacidad para la detección específica de hasta un 0,1 % de las correspondientes especies diana en todas las muestras procesadas a 133 °C. Este límite de detección está en concordancia con el mínimo establecido en los métodos oficiales de la UE. Asimismo, los resultados obtenidos indicaron que los diferentes tratamientos térmicos aplicados a los piensos, así como el tipo de tejido animal presente en su composición, influían en la señal de fluorescencia obtenida, limitando la capacidad cuantitativa de la técnica desde un punto de vista práctico.

Considerando los requisitos actuales de la UE sobre la comercialización de los piensos, y con el fin de ampliar el control de autenticidad y trazabilidad a todo el sector de la alimentación animal, los sistemas específicos de PCR en tiempo real desarrollados en este trabajo también se aplicaron al análisis de una amplia gama de piensos comerciales para mascotas. Los resultados obtenidos demostraron la capacidad de las técnicas de PCR en tiempo real para detectar las especies diana en los piensos, revelando la presencia de ingredientes animales no declarados en el etiquetado de algunos de los productos analizados.

Una de las limitaciones de las técnicas de PCR en tiempo real está relacionada con la detección de ingredientes autorizados en los piensos para la alimentación del ganado, componentes que también pueden constituir una fuente de ADN animal. Por ello, en esta Tesis Doctoral se evaluó el potencial de metodologías analíticas alternativas basadas en marcadores epigenéticos de metilación del ADN para la identificación y diferenciación de ingredientes animales autorizados y prohibidos en los piensos. Concretamente, se seleccionó la región promotora del gen que codifica la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) del genoma bovino y se analizó el estado de metilación de un fragmento de ADN de 139 pb en varios tejidos de esta especie mediante una técnica de modificación del ADN con bisulfito y pirosecuenciación. Si bien los resultados obtenidos revelaron la existencia de patrones de metilación específicos de tejido en varias posiciones CpG del fragmento diana, la aplicabilidad de este marcador epigenético en matrices tratadas térmicamente como los piensos requeriría análisis adicionales a partir de un muestreo representativo de tejidos procedentes de diferentes ingredientes animales, tanto permitidos como prohibidos.

Se puede concluir que las técnicas genéticas desarrolladas en esta Tesis Doctoral proporcionan herramientas específicas y sensibles para el control de autenticidad de ingredientes animales en piensos, contribuyendo al cumplimiento de las normas de trazabilidad y etiquetado de la UE.

Traceability and correct labeling of feed are essential issues to prevent frauds and to avoid potential safety risks caused by introduction of any food ingredient that might be harmful to human and/or animal health. In the context of transmissible spongiform encephalopathies (TSEs) eradication programs, the European Union (EU) has established a ban on the use of processed animal proteins (PAPs) in feeds for farmed animals, with certain limited exceptions. Moreover, material derived from animals should not be fed to animals of the species from which it is derived (intra-species recycling ban). In this context, to ensure the proper accomplishment of the legislation in force, sensitive and reliable analytical techniques that can identify the source of all ingredients present in feeds are of prime importance. The microscopic official method, based on the detection of animal bone fragments, can detect animal proteins at sufficiently low levels (0.1 %). However, this method is time consuming, requires specialized staff and it does not allow the determination of the species origin of the feed, limiting the identification essentially to the animal class. As consequence, in the latest years the EU has prompted the use of alternative methods to improve detection and gain precise information on feed species composition. Considering these aspects, the aim of this PhD Thesis was the development of TaqMan<sup>®</sup> real-time PCR methodologies for authenticity and traceability control of animal ingredients used in feed formulations. The species targeted in this work were: cow (*Bos taurus*), sheep (*Ovis aries*), goat (*Capra hircus*), ruminant group, swine (*Sus scrofa*), chicken (*Gallus gallus*), turkey (*Meleagris gallopavo*), duck (*Anas platyrhynchos* x *Cairina moschata*), goose (*Anser anser*), avian group, horse (*Equus caballus*), rabbit (*Oryctolagus cuniculus*), hare (*Lepus capensis*), leporid group (rabbit and hare) and fish.

Firstly, mitochondrial nucleotide sequences (polymorphic D-loop region and 12S and 16S rRNA genes) were selected, and specific primer pairs were designed for selective amplification of small DNA fragments (between 62 and 118 bp) in all target species. Additionally, TaqMan<sup>®</sup> probes were designed to anneal within the DNA fragments generated by amplification of each target. All primers/probe real-time PCR systems positively detected their corresponding species, whereas no amplification signal was obtained on the wide array of non-target animal and plant species tested.

Once assay performance criteria were verified (PCR efficiency, linear dynamic range, sensitivity, trueness and precision), the applicability of the real-time PCR techniques was evaluated in farm feeds representative of the real world feed ingredients and processing treatments dictated by the EU. For this purpose, a broad range of industrial feeds provided by the European Union Reference Laboratory for Animal Proteins in feedingstuffs (EURL-AP, Belgium) and the Co-operative Central Laboratory (CCL-NutriControl, The Netherlands) were analyzed. Feeds consisted of different ruminant and non-ruminant PAPs, either alone (100 %) or in a mixed feed matrix, rendered at temperatures from 125, 133, 141, 145 to 159 °C, during 20 minutes at hyperbaric pressure.

Results obtained showed a clear increase in the fluorescence values as the pressure sterilisation conditions became more drastic, restricting the sensitivity of the assay in those feeds with the lowest target content and rendered at the highest temperatures. Nevertheless, all the real-time PCR systems allowed sensitive and unequivocal detection of up to 0.1 % of the corresponding target species in all samples treated at 133 °C. This detection limit is in agreement with the analytical sensitivity of the EU official methods set for PAPs in feed. Although the real-time PCR technique developed showed quantitative potential, results obtained suggested that the heterogeneous tissue-types that can be present in feeds, together with the different processing treatments applied in the rendering plants, may lead to measurement uncertainties restricting the quantitative applicability of the assay from a practical point of view.

Considering the current EU requirements on the marketing and use of feed, and in order to ensure comprehensive and consistent application of traceability schemes throughout the animal feed industry, the developed real-time PCR systems were also applied to the analysis of a wide representation of commercial pet food products. The results demonstrated the ability of the real-time PCR techniques to detect small percentages of the target species in the feeds, revealing the presence of undeclared animal ingredients in some of the analyzed products.

Although highly specific and mostly unaffected by the rendering process, one of the reported drawbacks of PCR-based methods is linked to the fact that authorized feed ingredients may also be sources of animal DNA. Therefore, an additional aim of this Thesis was to evaluate the potential of alternative methodologies based on epigenetic DNA methylation markers for the identification and differentiation of authorized and prohibited ingredients in farm feeds. In particular, a novel tissue-specific epigenetic marker, the bovine glial fibrillary acidic protein (GFAP) gene promoter region, was identified and the methylation status of a 139 bp DNA fragment from different bovine tissues was analyzed by a technique based on bisulfite DNA modification and pyrosequencing. The results obtained revealed the existence of tissue-specific methylation patterns at various CpG sites of the targeted DNA fragment, which allowed successful tissue differentiation. However, the applicability of this epigenetic marker in thermally processed matrices such as feeds would require further investigations using a representative sampling of different permitted and banned animal feed ingredients.

It can be concluded that the genetic techniques developed in this work provide specific and sensitive tools to verify species authenticity of feed, thus contributing to compliance with traceability and labeling regulations of the EU.

# ***I. Exposición General del Problema a Investigar***







La producción de piensos constituye uno de los principales sectores de actividad económica de la agricultura a nivel mundial, al ser el factor de coste más importante para los cinco millones de ganaderos de la Unión Europea (UE). Además, el suministro de piensos seguros a los animales de abasto es un factor clave para garantizar la seguridad alimentaria. En este contexto, la aplicación de sistemas de trazabilidad que permitan identificar el origen de todas las materias primas e ingredientes que forman parte de los piensos es un requisito clave para garantizar su seguridad y autenticidad (Reglamento CE 178/2002, DOCE de 1 de febrero de 2002).

Desde la aparición en los años ochenta en el Reino Unido de los primeros casos de Encefalopatía Espongiforme Bovina (EEB), una epidemia que acabó transmitiéndose a humanos por el consumo de animales afectados, la UE comenzó a aplicar medidas para la prevención, control y erradicación de esta enfermedad y de cualquier Encefalopatía Espongiforme Transmisible (EET) (Reglamento CE 999/2001, DOCE de 31 de mayo de 2001). Desde su publicación, el Reglamento CE 999/2001 ha ido experimentando sucesivas modificaciones, particularmente con relación a las prohibiciones en materia de alimentación animal. Así, las harinas cárnicas compuestas de residuos animales y huesos, que se utilizaban tradicionalmente para elaborar piensos compuestos, quedaron prohibidas radicalmente en la UE al descubrirse que fueron las causantes de la EEB. Debido a estas medidas preventivas, en la actualidad la enfermedad se encuentra prácticamente erradicada. Según los datos más recientes de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE), los casos de EEB han ido disminuyendo paulatinamente desde el punto álgido de la epidemia a mediados de los noventa, con más de 40 000 casos anuales, a tan solo doce casos registrados en 2014 (tres en Francia, dos en Alemania, España y Rumanía, y uno en Brasil, Portugal y Reino Unido) (OIE, 2014). En los últimos años, a medida que se han ido reduciendo los casos de EEB, la UE ha introducido modificaciones en los controles en la alimentación de los animales de abasto. No obstante, la presencia de harinas cárnicas en los piensos, salvo excepciones, continúa prohibida en la actualidad.

Considerando que la transmisión de la EEB de especies no rumiantes a otros no rumiantes es muy poco probable (EFSA, 2007a, b), en los últimos años existe un amplio debate en torno a la posibilidad de eliminar la prohibición de utilizar proteínas animales transformadas de no rumiantes en los piensos para no rumiantes (porcinos, aves de corral y peces), respetando la prohibición del reciclado dentro de la misma especie (Reglamento CE 1069/2009, DOUE de 21 de octubre de 2009). En este escenario, la UE ha aprobado recientemente el Reglamento UE 56/2013 (DOUE de 24 de enero de 2013), por el que se autoriza la alimentación de los animales de acuicultura con proteínas animales transformadas procedentes de especies no rumiantes. De forma similar, cabría esperar en un futuro próximo la autorización del uso de proteínas procedentes de cerdos y aves de corral en la alimentación de no rumiantes (por ejemplo, la harina de carne y huesos procedente de aves de corral podría suministrarse a los cerdos, y la de porcinos a las aves de corral). Sin embargo, dicha autorización solo será posible si existe un adecuado control del proceso de producción y comercialización de las harinas cárnicas

de diferentes especies, y si se dispone de técnicas analíticas validadas específicas y sensibles para identificar el origen animal de las mismas (EFSA, 2011).

El método oficial tradicionalmente empleado para la detección de componentes de origen animal en los piensos es el análisis microscópico. Sin embargo, su aplicación se encuentra limitada a la hora de diferenciar entre los huesos de mamíferos y de aves, y de determinar el origen animal específico de las partículas detectadas. Por ello, la UE ha propuesto el desarrollo de técnicas analíticas alternativas rápidas que permitan identificar el origen de todas las materias primas presentes en los piensos. Las técnicas genéticas, basadas en el reconocimiento especie-específico de fragmentos de ácidos nucleicos presentes en los seres vivos, constituyen herramientas cada vez más extendidas para llevar a cabo la identificación de especies. Entre ellas, los ensayos de PCR en tiempo real con cebadores especie-específicos diseñados para la amplificación selectiva de fragmentos de ADN de pequeño tamaño (de 50 a 150 pares de bases, pb), parecen ser las técnicas más adecuadas para el análisis de matrices complejas como los piensos, que contienen varias especies en su composición, y en los que los tratamientos térmicos aplicados degradan el ADN (Fumière y col., 2006; Prado y col., 2007, 2009). A pesar de que la metodología de PCR en tiempo real se ha utilizado ampliamente para la diferenciación de especies en alimentos (Teletchea, 2009; Ballin, 2010; Bottero y Dalmaso, 2011), el número de trabajos publicados hasta el momento para el control de autenticidad de piensos es comparativamente más reducido.

Debido al demostrado potencial de la técnica de PCR en tiempo real aplicada a la detección de componentes de origen rumiante en los piensos (Fumière y col., 2012a, b), la UE aprobó el Reglamento UE 51/2013 (DOUE de 24 de enero de 2013), en el que se contempla la revisión de la técnica oficial de microscopía óptica y se propone un nuevo ensayo basado en la metodología de PCR en tiempo real para verificar la ausencia de material procedente de rumiantes en los controles de los piensos. Sin embargo, hasta la fecha, no existe un método oficial para la detección y diferenciación específica de harinas de otros mamíferos, aves y especies de pescado, cuya utilización en la alimentación animal, salvo ciertas excepciones, está también prohibida. Ello pone de manifiesto la necesidad de seguir avanzando en el desarrollo de metodologías rápidas y específicas que permitan mejorar la detección de componentes de origen animal en los piensos.

Por otra parte, para garantizar una aplicación integral y coherente de los principios de seguridad alimentaria y trazabilidad en todo el sector de la alimentación animal, desde el año 2009, el Reglamento CE 767/2009 (DOUE de 1 de septiembre de 2009) sobre la comercialización y la utilización de los piensos, ha hecho extensibles dichos principios a los piensos destinados a la alimentación de animales de compañía. Este reglamento incide explícitamente en la necesidad de un etiquetado claro y transparente que evite prácticas fraudulentas en este sector y garantice la autenticidad y seguridad de los productos comercializados.

Finalmente, es importante resaltar la adopción cada vez más generalizada en las industrias alimentarias de estándares privados de certificación de seguridad alimentaria, como el *International Featured Standards* (IFS) y el *British Retail Consortium* (BRC), en cuyas cláusulas, recientemente revisadas, se contempla el empleo de técnicas moleculares basadas en el análisis de ADN para apoyar los sistemas de trazabilidad y control de autenticidad de las materias primas y productos terminados (BRC, 2015; IFS, 2014). Asimismo, se han publicado estándares internacionalmente reconocidos como las normas ISO (*International Organization for Standardization*), que establecen el empleo de metodologías genéticas para asegurar la trazabilidad y correcta identificación de los productos pesqueros (ISO, 2011a, b). En este escenario, también cabe mencionar que la Iniciativa Mundial de Seguridad Alimentaria (*Global Food Safety Initiative*, GFSI), cuyo propósito es promover la armonización y convergencia entre los diferentes esquemas de gestión de seguridad alimentaria, ampliará el alcance de su nueva versión que se publicará a principios de 2016, para incluir la necesidad de implantar procedimientos y estrategias analíticas eficaces que minimicen el fraude alimentario en todos los niveles de la cadena de suministro.

Teniendo en cuenta todo lo expuesto, el objetivo de esta Tesis Doctoral ha consistido en el desarrollo y aplicación de técnicas de PCR en tiempo real con sondas TaqMan® para el control de autenticidad y trazabilidad de ingredientes de origen animal utilizados en la fabricación de piensos. Han sido objeto de este trabajo las siguientes especies y grupos de especies: vaca (*Bos taurus*), oveja (*Ovis aries*), cabra (*Capra hircus*), grupo rumiante, cerdo (*Sus scrofa*), pollo (*Gallus gallus*), pavo (*Meleagris gallopavo*), pato (*Anas platyrhynchos* x *Cairina moschata*), oca (*Anser anser*), grupo aviar, caballo (*Equus caballus*), conejo (*Oryctolagus cuniculus*), liebre (*Lepus capensis*), grupo lepórido (conejo y liebre) y pescados. Para llevar a cabo este objetivo, ha sido necesario:

- 1) Diseñar cebadores y sondas TaqMan® empleando marcadores genéticos mitocondriales para la detección y diferenciación de las especies y grupos de especies animales de interés.
- 2) Desarrollar y validar sistemas de PCR en tiempo real empleando los cebadores y sondas TaqMan® diseñados para la detección específica de las especies diana en piensos.
- 3) Evaluar la aplicabilidad de las técnicas de PCR en tiempo real desarrolladas en el control de autenticidad de piensos destinados a la alimentación de animales de abasto y de mascotas.
- 4) Evaluar el potencial de marcadores epigenéticos basados en la metilación del ADN para la identificación y diferenciación de tejidos procedentes de ingredientes autorizados y prohibidos en los piensos.



## ***II. Introducción***





La libre circulación de alimentos y piensos genuinos e inocuos es un aspecto esencial del mercado interior y contribuye significativamente a la salud y bienestar humano y animal. En este contexto, las crisis alimentarias surgidas en las últimas décadas como las derivadas de la Encefalopatía Espongiforme Bovina (EEB), o la presencia en alimentos de contaminantes como benzopirenos, dioxinas, melamina, *etc.*, han impactado enormemente a la opinión pública creando alarma y confusión entre los consumidores. Como consecuencia, en los últimos años la Unión Europea (UE) ha emprendido una importante reforma política y legislativa en relación con la seguridad alimentaria. La trazabilidad de los alimentos y los piensos es la piedra angular de esta reforma, y sus fundamentos están recogidos en el Reglamento CE 178/2002 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 28 de enero de 2002 (DOCE de 1 de febrero de 2002), por el que se establecen los principios y los requisitos generales de la legislación alimentaria, se crea la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA, *European Food Safety Authority*) y se fijan procedimientos relativos a la seguridad alimentaria. Este reglamento define la trazabilidad como *“la posibilidad de encontrar y seguir el rastro, a través de todas las etapas de producción, transformación y distribución de un alimento, un pienso o de un animal destinado a la producción de alimentos, así como de cualquier sustancia destinada a ser incorporada en alimentos o piensos o con probabilidad de serlo”*. La trazabilidad y la recuperación de un alimento o un pienso permiten a las empresas responder rápidamente ante incidentes de seguridad y calidad alimentaria, garantizando la inocuidad y autenticidad de los productos comercializados y protegiendo la integridad de la cadena de suministros, desde la granja hasta el consumidor. Asimismo, los reglamentos de higiene de los alimentos, entre los que se incluyen el CE 852/2004 y el CE 853/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 29 de abril de 2004 (DOUE de 25 de junio de 2004), confieren nuevamente una gran importancia a la trazabilidad de los alimentos e ingredientes alimentarios como factores clave de la seguridad alimentaria.

## II.1. PRODUCCIÓN Y COMERCIALIZACIÓN DE PIENSOS

La industria productora de piensos compuestos desempeña un papel líder en la industria global de alimentos, al estar vinculada con actividades económicas de importancia mundial, tales como la obtención de alimentos de origen animal y la producción de alimentos para mascotas (FAO e IFIF, 2014). El Reglamento CE 178/2002 (DOCE de 1 de febrero de 2002), define el pienso como *“cualquier sustancia o producto, incluidos los aditivos, destinado a la alimentación por vía oral de los animales que sirven para la producción de alimentos o para los animales de compañía, tanto si ha sido transformado entera o parcialmente, como si no”*.

Atendiendo a la legislación europea, los piensos incluyen distintas formas de presentación (materias primas para piensos, piensos compuestos, aditivos para piensos, premezclas, y piensos medicamentosos):

- Materias primas para piensos: productos de origen vegetal o animal, cuyo principal objetivo es satisfacer las necesidades nutritivas de los animales, en estado



natural, fresco o conservado, y los productos derivados de su transformación industrial, así como las sustancias orgánicas o inorgánicas, tanto si contienen aditivos para piensos como si no, destinadas a la alimentación de los animales por vía oral, directamente como tales o transformadas, o en la preparación de piensos compuestos o como soporte de premezclas (Reglamento CE 767/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 13 de julio de 2009, sobre la comercialización y la utilización de los piensos, DOUE de 1 de septiembre de 2009).

- Pienso compuesto: mezcla de, al menos, dos materias primas para piensos, tanto si contienen aditivos para piensos como si no, para la alimentación de los animales por vía oral en forma de pienso completo o complementario (Reglamento CE 767/2009, DOUE de 1 de septiembre de 2009).

- Aditivo para alimentación animal: sustancias, microorganismos y preparados distintos de las materias primas para piensos y de las premezclas, que se añaden intencionadamente a los piensos o al agua, con el fin de influir favorablemente en las características del pienso, de los productos animales o en el color de los pájaros y peces ornamentales, o satisfacer las necesidades alimenticias de los animales, o mejorar las repercusiones medioambientales de la producción animal o el bienestar animal, especialmente actuando en la flora gastrointestinal o la digestibilidad de los piensos, o tener un efecto coccidiostático o histomonostático (Reglamento CE 1831/2003 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 22 de septiembre de 2003, sobre los aditivos en la alimentación animal, DOUE de 18 de octubre de 2003).

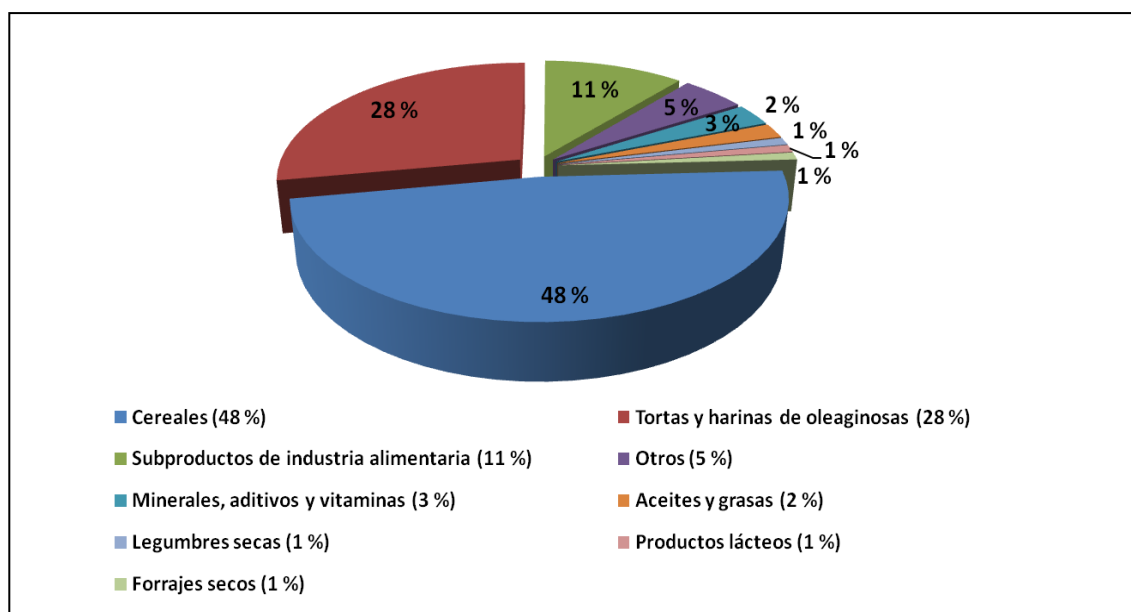
- Premezclas: mezclas de aditivos para alimentación animal, o mezclas de uno o más aditivos para alimentación animal con materias primas para piensos o agua utilizadas como soporte que no se destinan a la alimentación directa de los animales (Reglamento CE 1831/2003, DOUE de 18 de octubre de 2003).

- Pienso medicamentoso: toda mezcla de premezcla medicamentosa y de pienso preparada previamente a su comercialización, y destinada a ser administrada a los animales sin transformación, en razón de las propiedades curativas, preventivas o de otras propiedades de la premezcla (Directiva CEE 90/167 del Consejo, de 26 de marzo de 1990, por la que se establecen las condiciones de preparación, de puesta en el mercado y de utilización de los piensos medicamentosos en la Comunidad, DOCE de 7 de abril de 1990).

Los piensos emplean un número amplio de materias primas agrarias y no agrarias que pueden ser de origen vegetal, animal, o proceder de otras sustancias orgánicas o inorgánicas. En la Unión Europea, la lista de las materias primas para piensos se recoge en el Reglamento UE 68/2013 de la Comisión, de 16 de enero de 2013 (DOUE de 30 de enero de 2013). En este reglamento, las principales materias primas para la alimentación animal, se clasifican en trece grupos: 1) granos de cereales y sus productos derivados; 2) semillas oleaginosas, frutos oleaginosos y sus productos derivados; 3) semillas de leguminosas y sus productos derivados; 4) tubérculos, raíces y sus productos derivados;

5) otras semillas y frutos, y sus productos derivados; 6) forrajes y forrajes groseros, y sus productos derivados; 7) otras plantas, algas y sus productos derivados; 8) productos lácteos y sus productos derivados; 9) productos de animales terrestres y sus productos derivados; 10) pescados, otros animales acuáticos y sus productos derivados; 11) minerales y sus productos derivados; 12) productos y subproductos de procesos de fermentación de microorganismos; y 13) varios.

Según el Anuario de Estadística para Alimentos y Piensos de la Federación Europea de Fabricantes de Piensos Compuestos (FEFAC, *Federation Europeenne des Fabricants d'Aliments Composes pour Animaux*) (Figura 1), los cereales representan la principal materia prima utilizada en la fabricación de los piensos para animales de producción, con un 48 % del total. El siguiente ingrediente mayoritario son las tortas y harinas oleaginosas, principalmente de soja, que representan el 28 %. A continuación, y de forma más minoritaria, los piensos compuestos incluyen otra serie de ingredientes de origen animal y vegetal que le confieren el equilibrio necesario para que cumplan con las necesidades energéticas de proteína, grasas e hidratos de carbono de los animales (FEFAC, 2012).



**Figura 1.** Uso de distintas materias primas en los piensos compuestos en la Unión Europea-27 en 2012.

Fuente: Anuario de Estadística para Alimentos y Piensos (FEFAC, 2012).  
<http://www.fefac.eu/>

Los animales de abasto necesitan en su dieta un complemento proteico de calidad para poder mantener un crecimiento eficiente. Aunque las proteínas que se les suministran son fundamentalmente de origen vegetal, necesitan estar complementadas con ciertos aminoácidos (lisina, metionina y triptófano) cuyas fuentes más idóneas desde un punto de vista nutricional son las harinas animales y las procedentes del pescado. Por estos motivos, las harinas animales se incorporaron a los piensos

compuestos hasta que, como consecuencia de la aparición de la Encefalopatía Espongiforme Bovina (EEB), se prohibió su utilización, primero en el Reino Unido y posteriormente en otros países de la UE.

La Tabla 1 incluye los datos de producción y consumo de materias primas para piensos ricos en proteína en la UE durante el período 2010-2011. Como se observa en la tabla, las harinas de soja son la fuente proteica más utilizada en piensos compuestos fabricados en la Unión, con el 50 % del consumo total, estimado en 67 millones de toneladas métricas (t) anuales. Sin embargo, el nivel de autosuficiencia de estas harinas es sólo del 3 %, reflejando el actual déficit de proteínas de la Unión y la consiguiente dependencia de los mercados exteriores. Por ello, varios estudios realizados por la FAO, la Comisión y las autoridades competentes de los Estados miembros, han incidido en la necesidad de aumentar la producción de proteaginosas y, en particular, el cultivo de las plantas leguminosas (Resolución del Parlamento Europeo, de 8 de marzo de 2011). Según los datos recogidos en la Tabla 1, las leguminosas en grano, excluyendo la soja, solo representan el 4 % de fuente proteica consumida en los piensos de la Unión.

**Tabla 1.** Balance de materias primas ricas en proteínas de la Unión Europea (2010-2011).

	Producción UE		Consumo UE <sup>1</sup>		Autosuficiencia (%)
	Producto	Proteína	Producto	Proteína	
<b>Harinas de soja</b>	1189*	452	34 134	15 904	3
<b>Harinas de colza y girasol</b>	27 481	5213	19 721	6329	82
<b>Legumbres secas</b>	3045	670	2800	616	109
<b>Forrajes secos</b>	4056	771	3900	741	104
<b>Otros</b>	2877	654	5859	1260	52
<b>Harinas de pescado</b>	398	275	599	433	67
<b>Total</b>	<b>39 047</b>	<b>8039</b>	<b>67 013</b>	<b>25 263</b>	<b>32</b>

UE: Unión Europea; <sup>1</sup> Incluye consumo de piensos para animales de abasto y animales de compañía; \* (x 1000 t).

Fuente: Anuario de Estadística para Alimentos y Piensos (FEFAC, 2012). <http://www.fefac.eu/>

Teniendo en cuenta las actuales prohibiciones del uso de proteínas animales en los piensos destinados a animales de abasto, las harinas de pescado son consideradas una buena fuente alternativa de proteínas, y están permitidas como ingrediente en los piensos para no rumiantes, piscicultura y crías de rumiantes de granja. Sin embargo, el empleo de estas harinas en la producción de piensos compuestos es más restringido que

el de otras fuentes proteicas (inferior al 1 % del total de proteínas consumidas) (Tabla 1). Así, en los piensos de ponedoras y de acabado de animales de abasto se limita su inclusión a un máximo del 5 % de la ración, para evitar la aparición de olores y sabores a pescado y la aparición de canales con grasa blanda insaturada.

Superar el déficit proteico actual y reducir gradualmente las importaciones de soja y otras materias primas para piensos constituyen una prioridad para la Unión Europea. Entre otras medidas, en los últimos años se está considerando sustituir las fuentes vegetales por proteínas animales transformadas procedentes de no rumiantes para producir piensos destinados a animales monogástricos (cerdos y aves de corral). No obstante, ello implicaría otra serie de condicionantes como el cumplimiento del principio de no canibalismo, y la disponibilidad de estrategias que permitan identificar el origen de todas las materias primas presentes en los piensos (Resolución del Parlamento Europeo, de 8 de marzo de 2011).

Con relación a la producción mundial de piensos compuestos, los últimos datos disponibles en el Anuario de Estadística para Alimentos y Piensos de la FEFAC muestran un aumento entre los años 2005 y 2012 (Tabla 2) (FEFAC, 2012). En la actualidad, el continente líder en producción de piensos compuestos es Asia, con una media de producción de 260 millones de toneladas métricas anuales en los últimos cinco años. Europa ocupa el tercer puesto, detrás del Continente Americano, y registra un crecimiento constante en la producción de piensos durante el período 2005-2012.

Dentro de la Unión Europea, el principal país productor de piensos compuestos es Alemania con 23,1 millones de toneladas métricas producidas en 2012, seguido por España, Francia, Reino Unido, Italia y Países Bajos (Figura 2). Como se observa en la figura, España se encuentra entre los principales países fabricantes de piensos, produciendo alrededor del 21,3 % del volumen global de pienso compuesto de la Unión.

La Tabla 3 recoge los datos más recientes recabados por el Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente (MAGRAMA) sobre la producción de piensos en España durante 2012. La tabla muestra los datos numéricos de producción por Comunidades Autónomas, incluyendo una clasificación de los piensos por especie o grupos de especies. Como se observa, en 2012 la producción total de piensos alcanzó algo más de 29 millones de toneladas métricas, lo que supone un descenso del 4,93 %, con respecto al 2011 (MAGRAMA, 2012).

Las Figuras 3 y 4 ilustran, de forma gráfica, los datos incluidos en la Tabla 3. En ellas se muestra la distribución de piensos por especie (Figura 3) y por Comunidades Autónomas (Figura 4) a lo largo de 2012. Como se desprende de la Figura 3, la producción de pienso para porcino destaca en primer lugar, con cerca del 46 % del total de pienso fabricado, seguido del pienso para bovinos (22 %), aves (19 %), y ovino y caprino (6 %). Entre otras producciones relevantes se encuentran la producción de pienso para animales de compañía, con un 3 % del total, y piensos para conejos y equinos, con un 2 % y un 1 % del total, respectivamente (MAGRAMA, 2012).

**Tabla 2.** Datos de producción mundial de piensos compuestos (2005-2012).

	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012
Unión Europea-27	145*	145	151	154	148	152	155	157
Resto de Europa	29	33	37	40	34	36	51	57
<b>Total Europa</b>	<b>174</b>	<b>178</b>	<b>188</b>	<b>194</b>	<b>182</b>	<b>187</b>	<b>206</b>	<b>214</b>
China	73	81	93	106	107	109	175	198
Japón	24	24	24	24	24	24	25	25
Resto de Asia y Pacífico	79	82	87	88	84	85	103	127
<b>Total Asia y Pacífico</b>	<b>176</b>	<b>187</b>	<b>204</b>	<b>218</b>	<b>215</b>	<b>218</b>	<b>303</b>	<b>350</b>
Brasil	47	48	54	59	58	60	60	66
México	24	25	26	26	27	27	26	29
Estados Unidos	150	152	153	155	149	155	165	169
Canadá	23	23	23	21	20	20	20	20
Resto de América	26	29	29	29	24	25	41	42
<b>Total América</b>	<b>270</b>	<b>277</b>	<b>285</b>	<b>290</b>	<b>278</b>	<b>287</b>	<b>312</b>	<b>326</b>
<b>Oriente Medio y África</b>	<b>25</b>	<b>25</b>	<b>28</b>	<b>29</b>	<b>32</b>	<b>30</b>	<b>46</b>	<b>55</b>
<b>Total</b>	<b>645</b>	<b>668</b>	<b>705</b>	<b>730</b>	<b>708</b>	<b>723</b>	<b>867</b>	<b>945</b>

(x 1 000 000 t)

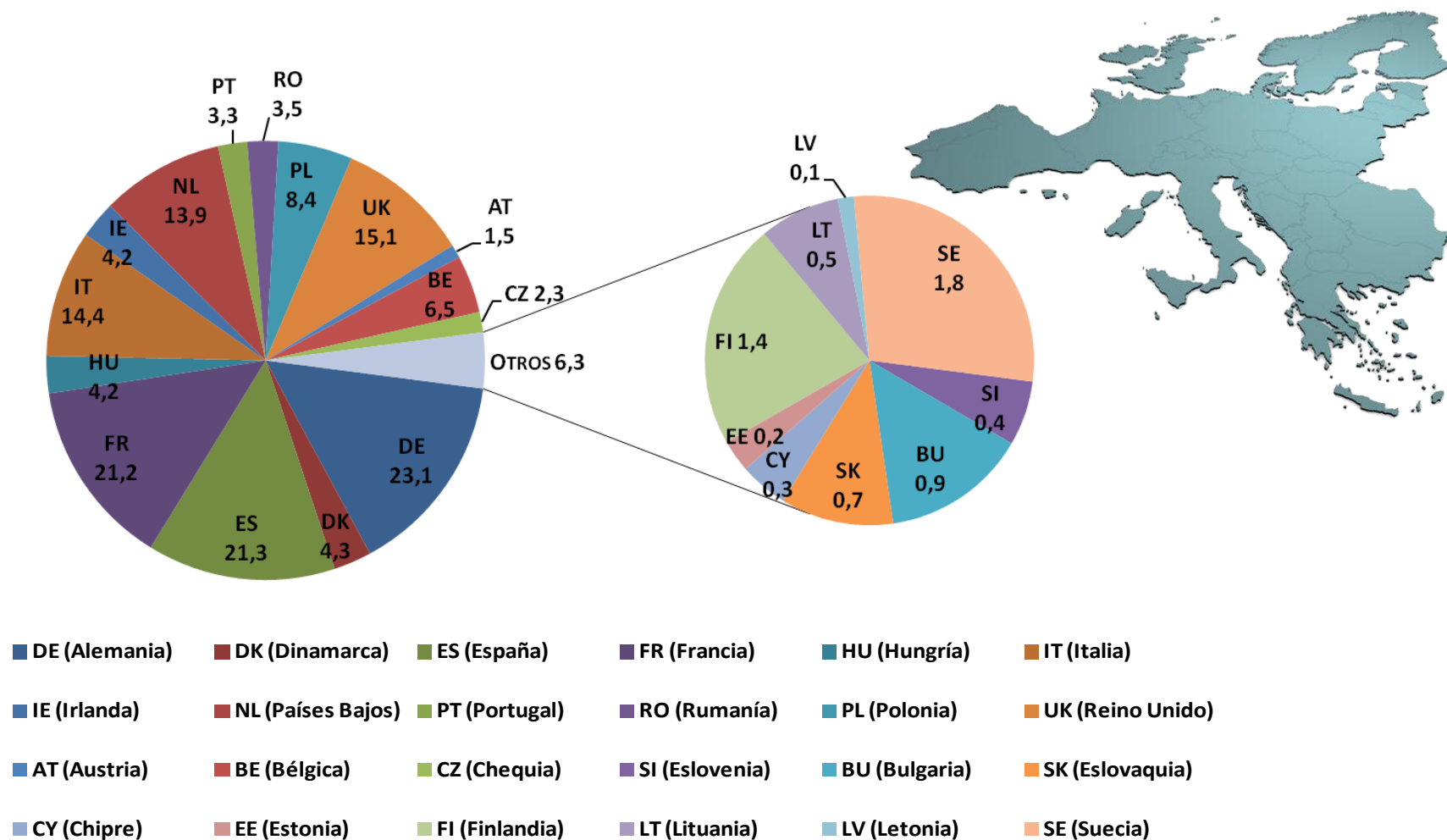
Fuente: Anuario de Estadística para Alimentos y Piensos (FEFAC, 2012). <http://www.fefac.eu/>

En cuanto a la producción de piensos por Comunidades Autónomas (Figura 4), Cataluña es la primera productora de piensos en España, con el 21,3 % de la producción total. En segundo lugar se sitúa Castilla y León, con un 14,6 % del total, seguido de Aragón (12,6 %) y Galicia (9,4 %). Tras estas Comunidades Autónomas se sitúan Andalucía y Murcia, con un 8 %, seguidas de Castilla la Mancha con un 6,5 %. Valencia y Extremadura producen, respectivamente, el 5 % y el 4,4 % de la producción nacional de piensos (MAGRAMA, 2012).

El creciente aumento en el número de mascotas, así como de la atención y cuidados que se les presta, indican el gran potencial de la industria de piensos para animales de compañía. Este sector constituye un mercado muy dinámico y en constante crecimiento en las últimas décadas, representando alrededor del 80 % del total del sector económico destinado a los animales de compañía (de Silva y Turchini, 2008). Según datos la Comisión Europea, se calcula que existen unos 64 millones de gatos, 60 millones de perros, 8 millones de acuarios y 65 millones de otros animales de compañía en el territorio, que consumen 8,3 millones de toneladas de alimentos especiales para ellos cada año, por un valor de 13 500 millones de euros. Concretamente en España, el censo de mascotas para el año 2012, realizado por la Federación Europea de la Industria de Alimentos para Animales de Compañía (FEDIAF), incluye 5,4 millones de perros,

3,8 millones de gatos, 3,2 millones de pájaros, 420 000 acuarios con peces y 220 000 reptiles (FEDIAF, 2012).

El mercado de los piensos para animales de compañía sigue una pauta similar al de la alimentación humana, particularmente en el caso de los productos de larga duración o no perecederos. Es un mercado marquista, canalizado en gran medida a través de la gran distribución y en el que la variedad de gama se ajusta cada vez más al cometido de la alimentación humana, como ocurre con los alimentos funcionales (MAPA, 2004). Según los datos de la Asociación Nacional de Fabricantes de Alimentos para Animales de Compañía (ANFAAC) obtenidos en 2013 a partir de estadísticas internas sobre el mercado de piensos para perros y gatos (Tabla 4), el alimento seco es el formato más adquirido por los clientes, con un valor total de más de 500 millones de euros anuales. No obstante, la comida húmeda tiene también una amplia aceptación en gatos, con un 29 % del total del valor de ventas. Por especies, los alimentos para perros son con diferencia, los que tienen más peso, tanto en volumen como en valor de ventas, con 416 314 toneladas métricas y 414 429 millones de euros, respectivamente (ANFAAC, 2013).



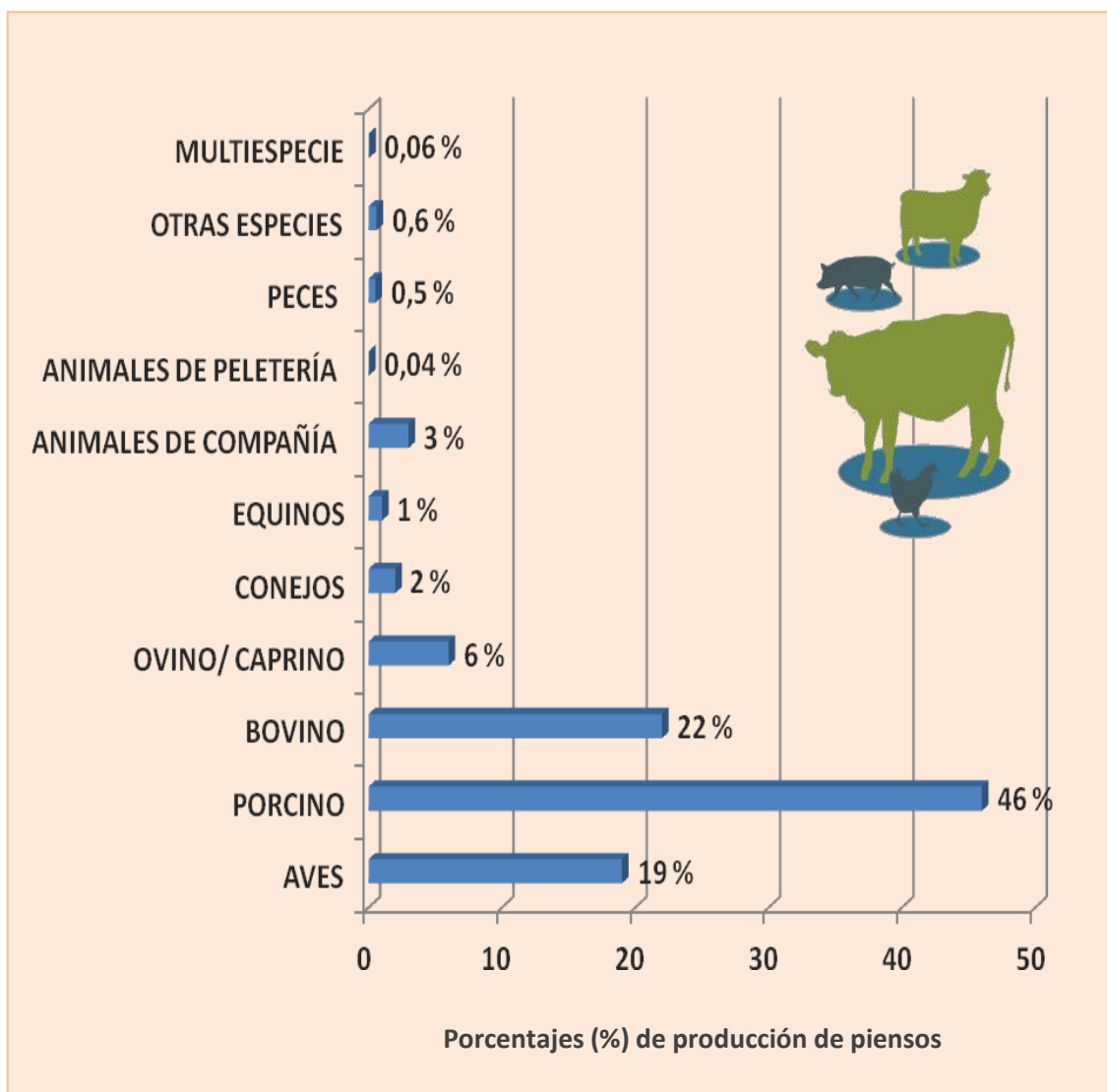
**Figura 2.** Producción de piensos compuestos en la Unión Europea-27 (sin Luxemburgo, Grecia y Malta) en 2012 (Total: 153,5 millones de t). Fuente: Anuario de Estadística para Alimentos y Piensos (FEFAC, 2012). <http://www.fefac.eu/>

**Tabla 3.** Datos de producción nacional de piensos en toneladas métricas (t) por especie y Comunidad Autónoma en 2012.

	Aves	Porcino	Bovino	Ovino y caprino	Conejos	Equino	Acuicultura	Perros	Gatos	Otras mascotas	Otras especies	Multiespecie	Total
<b>ANDALUCÍA</b>	707 887	794 018	533 426	221 377	8883	62 613	0	0	0		369	8399	<b>2 336 971,78</b>
<b>ARAGÓN</b>	350 106	2 456 305	541 259	134 554	80 819	12 348	0	87 541	22 475	0	1640	861	<b>3 687 909,09</b>
<b>ASTURIAS</b>	19 975	9386	367 745	1955	42 541	12 066	0	0	0		0	4193	<b>457 863,46</b>
<b>BALEARES</b>	22 828	10 882	15 133	1539	701	2555	0	0	0		9	184	<b>53 830,62</b>
<b>CANARIAS</b>	83 906	17 852	22 329	117 142	9655	8470	0	0	0		0	8347	<b>267 701,58</b>
<b>CANTABRIA</b>	3583	698	213 814	978	502	1574	0	0	0		0	2	<b>221 150,90</b>
<b>C. MANCHA</b>	654 714	433 339	541 346	241 352	4122	11 056	0	14 281	286	516	4355	131	<b>1 905 498,91</b>
<b>C. LEÓN</b>	486 132	1 835 933	1 090 615	430 960	62 205	24 644	133 529	143 373	24 130	561	7040	24 565	<b>4 263 693,09</b>
<b>CATALUÑA</b>	1 196 577	3 803 965	667 621	69 066	101 007	95 968	0	184 268	51 378	849	343	53 412	<b>6 224 454,58</b>
<b>EXTREMADURA</b>	195 862	580 540	338 197	146 343	2026	8326	0	23	0	0	1482	3624	<b>1 276 423,02</b>
<b>GALICIA</b>	678 690	667 777	1 226 061	5444	78 416	11 928	24	11 618	1487	0	52	59 880	<b>2 753 589,61</b>
<b>RIOJA</b>	69 407	22 631	17 164	324	32	574	0	0	0	0	0	0	<b>110 132,45</b>
<b>MADRID</b>	70 427	89 582	67 374	13 861	1488	13 522	0	34 847	2493	269	1616	0	<b>295 478,50</b>
<b>MURCIA</b>	200 705	1 585 179	358 772	131 791	19 460	7 717	0	29 933	1908	972	0	0	<b>2 336 436,54</b>
<b>NAVARRA</b>	276 472	467 652	279 024	72 257	2364	10 280	0		17	0	0	0	<b>1 108 065,85</b>
<b>PAÍS VASCO</b>	97 642	10 275	113 342	16 854	12 858	2733	0	161 974	19 330	0	1483	0	<b>436 492,49</b>
<b>VALENCIA</b>	513 003	707 428	78 563	37 156	83 172	14 607	0	1767	0	18 876	183	915	<b>1 455 671</b>
<b>Total</b>	<b>5 627 918</b>	<b>13 493 442</b>	<b>6 471 787</b>	<b>1 642 952</b>	<b>510 252</b>	<b>300 980</b>	<b>133 553</b>	<b>669 643</b>	<b>123 488</b>	<b>22 043</b>	<b>18 590</b>	<b>164 513</b>	<b>29 191 381</b>

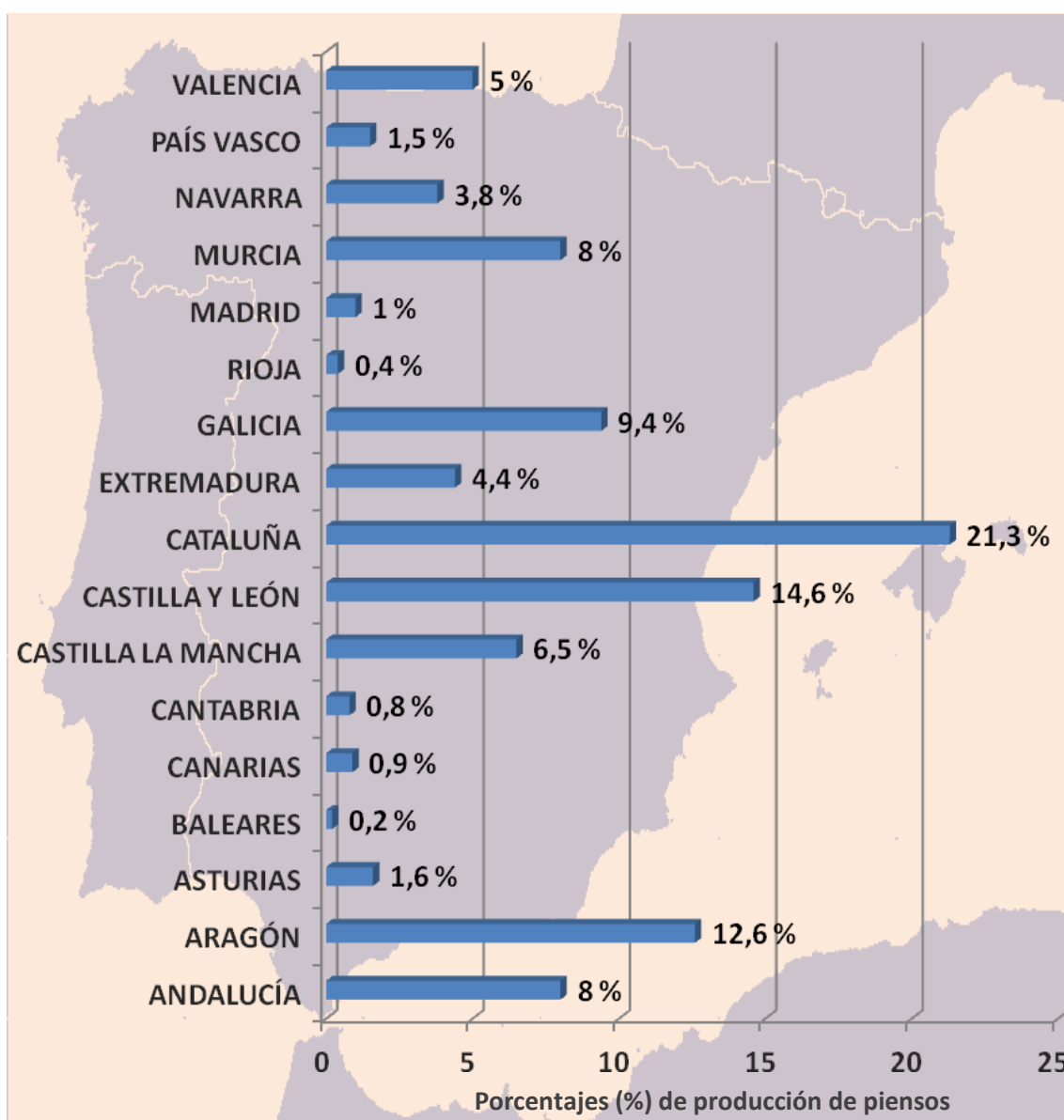
Fuente: Informe sobre datos de producción de piensos en España en 2012 (MAGRAMA, 2012)





**Figura 3.** Producción de piensos en España por especies en 2012.



*Fuente: Informe sobre datos de producción de piensos en España en 2012 (MAGRAMA, 2012)*



**Figura 4.** Producción de piensos en España por Comunidades Autónomas en 2012.

*Fuente: Informe sobre datos de producción de piensos en España en 2012 (MAGRAMA, 2012)*

**Tabla 4.** Volumen y valor de ventas para piensos de animales de compañía (perros y gatos) en 2013.

Especie	Formato	Volumen de ventas (toneladas métricas)	Valor de ventas (millones de €)
	Alimento seco + <i>snacks</i>	402 529	386 395
	Alimento húmedo	13 785	28 033
	Total perros	416 314	414 429
	Alimento seco + <i>snacks</i>	101 850	144 548
	Alimento húmedo	20 152	58 280
	Total gatos	122 002	202 828
Total		538 316	617 257

Fuente: Macromagnitudes del sector (ANFAAC, 2013). <http://www.anfaac.org/>

## II.2. TRAZABILIDAD Y AUTENTICIDAD DE MATERIAS PRIMAS Y PIENSOS

### II.2.1. LEGISLACIÓN APLICABLE

La trazabilidad y el correcto etiquetado de los piensos y de sus ingredientes son factores esenciales para prevenir fraudes y garantizar su seguridad. En los últimos veinte años, la Unión Europea (UE) ha adoptado una amplia y compleja normativa enfocada a la prevención, el control y la erradicación de las Encefalopatías Espongiformes Transmisibles (EETs). Su objetivo es evitar una crisis alimentaria como la derivada de la Encefalopatía Espongiforme Bovina (EEB), y garantizar un elevado nivel de seguridad alimentaria para proteger la salud humana y animal. La Tabla 5 recoge la evolución de las principales disposiciones comunitarias relacionadas con la prevención y el control de las EETs y la utilización de subproductos animales en la alimentación de animales de producción. A continuación se exponen más detalladamente algunas de las principales medidas adoptadas por dicha normativa.

La primera disposición de la Unión Europea para prevenir la EEB fue la prohibición, en 1994, de utilizar proteínas derivadas de mamíferos en la alimentación de los rumiantes (Decisión 94/381/CE del Consejo, DOCE de 7 de julio de 1994). Esta prohibición parcial se amplió el 1 de enero de 2001 a la suspensión temporal en la Unión Europea del uso de proteínas animales en la alimentación de cualquier animal de granja, con ciertas excepciones (Decisión 2000/766/CE del Consejo, DOCE de 7 de diciembre de 2000). Posteriormente, el Reglamento CE 999/2001 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 22 de mayo de 2001 (DOCE de 31 de mayo de 2001), consolidó la prohibición y estableció nuevas disposiciones para la prevención, el control y la erradicación de determinadas EETs. Este reglamento prohibió la utilización de proteínas procedentes de mamíferos en la alimentación de rumiantes y de cualquier otro mamífero, con excepción de perros y gatos, así como la utilización de grasas fundidas de rumiantes en la alimentación de cualquier rumiante. Desde su publicación en mayo de

2001, el reglamento ha ido experimentando sucesivas modificaciones. En particular el anexo IV del artículo 7, en el que se establecen las prohibiciones en materia de alimentación animal, ha sido ampliado y corregido por varios reglamentos posteriores.

En el año 2005, el Reglamento CE 1234/2003 de la Comisión, de 10 de julio de 2003 (DOUE de 11 de julio de 2003) derogó las Decisiones anteriores (2000/766/CE y 2001/9/CE) y amplió las prohibiciones del Reglamento CE 999/2001 relativas a la alimentación animal. En concreto, este reglamento prohibió la utilización de proteínas animales transformadas, de gelatina proveniente de rumiantes, de productos sanguíneos, de proteínas hidrolizadas, de fosfato dicálcico y de fosfato tricálcico de origen animal en la alimentación de animales de granja, con excepción de los carnívoros destinados al aprovechamiento de su piel. A su vez, en esta normativa se autorizaba la alimentación de: i) no rumiantes con las proteínas hidrolizadas derivadas de no rumiantes, pieles y cueros de rumiantes, harina de pescado y fosfato dicálcico y tricálcico, siempre y cuando se cumplieran determinados requisitos en su elaboración; ii) rumiantes con las proteínas procedentes de la leche, productos lácteos y calostro, los huevos y ovoproductos y la gelatina de no rumiantes; y iii) peces con productos derivados de la sangre y harina de sangre procedentes de no rumiantes, siempre y cuando hayan sido transformados.

El Reglamento CE 1292/2005 de la Comisión, de 5 de agosto de 2005 (DOUE de 6 de agosto de 2005), modificó de nuevo el anexo IV del Reglamento CE 999/2001 en lo que respecta a la alimentación animal, y autorizó el uso de proteínas hidrolizadas procedentes de partes de no rumiantes y de pieles y cueros de rumiantes en la alimentación de animales de granja, así como de productos derivados de la sangre procedentes de no rumiantes en la alimentación de animales de granja no rumiantes.

En marzo de 2008 se completó un informe de la Dirección General de Sanidad y Consumo de la UE (DG SANCO, *Directorate General for Health and Consumer Affairs*, Bélgica) realizado con ayuda de varios expertos científicos. En ese informe se concluía que la harina de pescado es una fuente de proteínas fácilmente digestibles y con un buen perfil de aminoácidos en comparación con las proteínas vegetales que se emplean en los sustitutivos de la leche. Por tanto, esta harina podía autorizarse en la alimentación de las crías de rumiantes. Así, la Unión Europea aprobó el Reglamento CE 956/2008 de la Comisión, de 29 de septiembre de 2008 (DOUE de 30 de septiembre de 2008), que modificó el anexo IV del Reglamento CE 999/2001, permitiendo la alimentación de rumiantes de granja no destetados con harina de pescado.

Más recientemente, considerando que la mejora en los resultados de los laboratorios encargados del análisis de los piensos ha permitido detectar la presencia accidental de espículas óseas, especialmente en cultivos de tubérculos y raíces, y que resulta inevitable la contaminación ambiental de los piensos de origen vegetal por estas espículas durante la cosecha, la Unión Europea aprobó el Reglamento CE 163/2009 de la Comisión, de 26 de febrero de 2009 (DOUE de 27 de febrero de 2009), que introduce otra modificación del anexo IV del Reglamento CE 999/2001. Esta normativa deroga la norma de

tolerancia cero para la presencia de fragmentos de huesos en las materias primas de origen vegetal destinadas a la alimentación animal, permitiendo la alimentación de animales de granja con piensos de origen vegetal tras la detección de cantidades insignificantes de espículas óseas procedentes de contaminación ambiental.

Por otra parte, las crisis de seguridad alimentaria surgidas en los últimos años, han evidenciado las consecuencias del uso indebido de algunos subproductos animales para la salud pública y animal. Los subproductos animales se generan principalmente durante el sacrificio de animales para el consumo humano, la elaboración de determinados productos de origen animal, como los productos lácteos, y la eliminación de animales muertos o la aplicación de medidas de control de enfermedades. La Unión Europea produce, cada año, más de 15 millones de toneladas de subproductos animales no destinados al consumo humano. En concreto, España produce 1,6 millones de toneladas anuales en mataderos y unas 350 000 toneladas en explotaciones ganaderas, según estimaciones del Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente (MAGRAMA, 2014). Así, para la correcta gestión de los subproductos animales, el Parlamento y el Consejo Europeos aprobaron el Reglamento CE 1774/2002, de 3 de octubre de 2002 (DOCE de 10 de octubre de 2002), por el que se establecieron las normas sanitarias aplicables a los subproductos animales no destinados al consumo humano. Este reglamento clasificó los subproductos animales en tres categorías en función del grado de riesgo, introdujo el principio de "no canibalismo" (los animales no deben alimentarse con material derivado de su propia especie), y estableció disposiciones sobre las normas de procesamiento de los subproductos animales. En los últimos años, esta normativa ha ido experimentando diversas modificaciones hasta que, finalmente, fue sustituida por el Reglamento CE 1069/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 21 de octubre de 2009 (DOUE de 14 de noviembre de 2009), por el que se establecen las normas sanitarias aplicables a los subproductos animales y los productos derivados no destinados al consumo humano. Por tanto, desde el 4 de marzo de 2011, se fija un nuevo marco legal comunitario aplicable a los subproductos animales no destinados al consumo humano. El Reglamento CE 1069/2009 preserva las garantías fundamentales de la anterior normativa, que incluyen:

- La prohibición de alimentar animales con materiales procedentes de la misma especie (reciclado intraespecie o canibalismo).
- La clasificación de los subproductos de animales en tres categorías en función del grado de riesgo. Los residuos de más bajo riesgo son los categoría 3, que pueden utilizarse para la elaboración de piensos, incluidos los alimentos de animales de compañía, como proteína animal transformada, o ser destinados a usos no alimentarios como biogás o abono. Los de categoría 2 también pueden emplearse combustible o abono, y los de categoría 1, que están considerados como los de mayor riesgo, deben ser destruidos mediante incineración.
- La obligación para los Estados miembros y los explotadores de velar por que los subproductos animales se recojan y eliminen lo antes posible.

- La exclusión de los subproductos animales no aptos para el consumo humano de la cadena alimentaria de los animales de granja.
- La prohibición de alimentar a los animales de granja con residuos de cocina.

Además, incorpora una serie de medidas que proporcionan un marco jurídico más coherente para la gestión de los subproductos animales no destinados al consumo humano: a) introduce la noción de «producto final» en la fabricación de los subproductos animales, más allá del cual estos dejan de ser objeto de las normas que regulan este tipo de productos, ya que los riesgos potenciales han sido eliminados, y en su lugar se aplican las reglas generales de seguridad de los productos; b) reclasifica ciertos subproductos de categoría 2 como material de la categoría 3 para que puedan utilizarse con determinados fines de alimentación animal; c) contempla la posibilidad de modificar la clasificación actual de los subproductos animales en el marco del procedimiento de comitología. Así, un organismo como la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) o el Comité Científico de los Productos de Consumo (CCPC) evaluaría los posibles riesgos de un subproducto particular para la salud pública y animal antes de cualquier cambio; y d) exige la autorización previa para establecimientos y plantas donde se efectúen operaciones con subproductos animales que conlleven un grado de riesgo considerable para la salud pública y la salud animal.

En los últimos años, y hasta la fecha, existe un amplio debate en torno a la posibilidad de flexibilizar las prohibiciones de la UE en materia de alimentación animal. En concreto, en 2010 se publicó la Segunda hoja de ruta contra las EET (Comisión Europea, 2010) en la que se abordó una revisión global de las normas vigentes en materia de alimentación animal establecida en la legislación de la Unión. Esta comunicación concluye que la transmisión de la EEB de especies no rumiantes a otros no rumiantes es muy poco probable, y por tanto podría examinarse la posibilidad de levantar la prohibición de la utilización de proteínas animales transformadas de no rumiantes en los piensos para no rumiantes (porcinos, aves de corral y peces), aunque sin por ello eliminar la prohibición del reciclado dentro de la misma especie (Reglamento CE 1069/2009).

Considerando que la producción de la acuicultura ya ha demostrado su eficacia en relación con el cumplimiento de la prohibición del reciclado intraespecie, la Unión Europea publicó el Reglamento UE 56/2013 de la Comisión, de 16 de enero de 2013 (DOUE de 24 de enero de 2013), que modifica los anexos I y IV del Reglamento CE 999/2001, y en el que se autoriza el empleo de las proteínas animales transformadas procedentes de animales no rumiantes y los piensos que las contienen para alimentar animales de la acuicultura. De forma similar, como se ha señalado antes, cabría esperar en un futuro próximo la autorización del uso de la harina de carne y huesos procedente de aves de corral en la alimentación de los cerdos, y la de porcinos en los piensos para aves de corral. No obstante, esta flexibilización solo será posible si existe una adecuada canalización de las proteínas animales transformadas de diferentes especies, y si se

dispone de técnicas analíticas eficaces para determinar a qué especie pertenecen las proteínas animales que forman parte de los piensos.

La Figura 5 ilustra las actuales disposiciones sobre la prohibición y/o autorización, en cada caso, del uso de proteínas animales transformadas en alimentación animal. Como se observa en la figura, existen prohibiciones de carácter permanente y temporal. Las primeras quedan establecidas en el Reglamento CE 999/2001, donde se prohíbe de forma permanente utilizar proteínas de mamíferos en la alimentación de los rumiantes, así como en el Reglamento CE 1069/2009 que establece el principio de "no canibalismo". Por su parte, las prohibiciones recogidas en el Reglamento CE 1234/2003 tienen un carácter temporal, y corresponden a una ampliación de las prohibiciones permanentes a fin de evitar cualquier riesgo de contaminación cruzada de los piensos con proteínas de rumiantes.

Con relación a los ingredientes permitidos, en la actualidad, el Reglamento CE 999/2001 autoriza el uso de las proteínas animales transformadas en la alimentación de animales de compañía y carnívoros de peletería. Además, permite algunas excepciones como la alimentación de animales de granja con ciertas proteínas animales, así como otros ingredientes de origen animal (Tabla 6). Por último, la aprobación del Reglamento UE 56/2013 permite la utilización de proteínas animales transformadas procedentes de no rumiantes en la alimentación de animales de acuicultura.

Recientemente, se ha publicado el Real Decreto 578/2014, de 4 de julio de 2014 (BOE de 8 de julio de 2014), por el que se dictan las disposiciones para la aplicación en España de la normativa de la Unión Europea relativa a la alimentación de animales de producción con determinados piensos de origen animal. En concreto, se fijan requisitos estrictos durante la recogida, transporte y transformación de productos de origen animal permitidos en la alimentación de estos animales, a fin de evitar la introducción de proteínas de rumiantes en la cadena alimentaria. Asimismo, se establece la realización de muestreos y análisis periódicos de las proteínas animales transformadas y los piensos compuestos que las contienen.

De acuerdo con esta normativa, y sin perjuicio de lo dispuesto en la legislación europea, las proteínas animales transformadas para la alimentación de animales de acuicultura deben proceder exclusivamente de mataderos en los que no sacrifiquen rumiantes. Además, los hemoderivados autorizados para la alimentación de animales de granja no rumiantes, distintos de los de peletería, deben producirse en canales separados de los de rumiantes. Además, deberá realizarse un muestreo y análisis de cada lote de la sangre de porcino para detectar la presencia de proteínas de origen rumiante. El método de análisis utilizado deberá estar científicamente validado, y deberá basarse en la detección de ADN mediante la amplificación del mismo utilizando una técnica basada en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Por otra parte, se autoriza la producción de piensos compuestos para rumiantes, en establecimientos que también produzcan piensos compuestos para no rumiantes que contengan harina de pescado, fosfato dicálcico y tricálcico de origen animal o hemoderivados de no rumiantes,

siempre que se cumplan determinadas condiciones, como la separación física entre piensos para rumiantes y no rumiantes durante su procesado y transporte. Finalmente, autoriza la producción de piensos para rumiantes en establecimientos que también produzcan sustitutivos de la leche que contengan harina de pescado para rumiantes no destetados, en instalaciones físicamente separadas con el fin de evitar la contaminación cruzada.



**Tabla 5.** Síntesis cronológica de la normativa europea relativa a las Encefalopatías Espongiformes Transmisibles en materia de alimentación animal<sup>1</sup>, y a la gestión de los subproductos animales no destinados al consumo humano<sup>2</sup>.

Año	Normativa	Resumen del contenido
1994	D 94/381/CE <sup>1</sup>	Prohibición temporal de la utilización de proteínas de mamíferos en la alimentación de los rumiantes.
2000	D 2000/766/CE <sup>1</sup>	Prohibición temporal de la utilización de proteínas animales en la alimentación animal. <i>Total feed ban</i> .
2001	D 2001/9/CE <sup>1</sup>	Condiciones para la aplicación de la Decisión 2000/766/CE.
	R CE 999/2001 <sup>1</sup>	Prohibición permanente de la utilización de proteínas animales procedentes de mamíferos en la alimentación de rumiantes. <i>Permanent feed ban</i> .
2002	R CE 1774/2002 <sup>2</sup>	Normas sanitarias aplicables a los subproductos de origen animal no destinados al consumo humano (SANDACH). Clasificación de los subproductos animales en tres categorías en función del grado de riesgo que representan. Introducción del principio de "no canibalismo" (reciclado intraespecie). <i>Animal by-products (ABPs) regulation</i> .
2003	R CE 1234/2003 <sup>1</sup>	Ampliación de la prohibición establecida en el Reglamento CE 999/2001. <i>Extended feed ban/ Temporal feed ban</i> .
2005	R CE 1292/2005 <sup>1</sup>	Autorización del uso de productos derivados de la sangre en la alimentación de animales de granja no rumiantes, y proteínas hidrolizadas de partes de no rumiantes y de pieles y cueros de rumiantes en animales de granja.
2008	R CE 956/2008 <sup>1</sup>	Autorización del uso de la harina de pescado en la alimentación de las crías de rumiantes de granja no destetados.
2009	R CE 163/2009 <sup>1</sup>	Modificación de la norma de tolerancia cero para la presencia de fragmentos óseos en las materias primas de origen vegetal destinadas a la alimentación animal.
	R CE 1069/2009 <sup>2</sup>	Normas sanitarias aplicables a los subproductos de origen animal no destinados al consumo humano (SANDACH). Deroga el Reglamento CE 1774/2002, aunque mantiene sus principios básicos. Introduce el concepto de "producto final" en la fabricación de los subproductos animales. <i>ABPs regulation</i> .
2011	R UE 142/2011 <sup>2</sup>	Principios de implementación del Reglamento CE 1069/2009.
2013	R UE 56/2013 <sup>1</sup>	Reintroducción de las proteínas animales transformadas, distintas de la harina de pescado, procedentes de no rumiantes, en la alimentación de animales de acuicultura.
	R UE 68/2013 <sup>1</sup>	Catálogo de materias primas para piensos.

D: Decisión; R: Reglamento

Fuente: Elaboración propia

NORMATIVA APLICABLE AL USO DE PROTEÍNA ANIMAL EN PIENSOS EN LA UNIÓN EUROPEA					
Proteína animal transformada	Animales de producción				Animales de compañía y de peletería
	Rumiantes 	Cerdos 	Aves 	Pescados de acuicultura 	
Rumiante	P (Reglamento CE 999/2001)	T (Reglamento CE 1234/2003)	T (Reglamento CE 1234/2003)	T (Reglamento CE 1234/2003)	A (Reglamento CE 999/2001)
Porcina	P (Reglamento CE 999/2001)	P (Reglamento CE 1069/2009)	T (Reglamento CE 1234/2003)	A (Reglamento UE 56/2013)	A (Reglamento CE 999/2001)
Aviar	T (Reglamento CE 1234/2003)	T (Reglamento CE 1234/2003)	P (Reglamento CE 1069/2009)	A (Reglamento UE 56/2013)	A (Reglamento CE 999/2001)
Pescado	T <sup>1</sup> (Reglamento CE 1234/2003)	A (Reglamento CE 999/2001)	A (Reglamento CE 999/2001)	P (Reglamento CE 1069/2009)	A (Reglamento CE 999/2001)

**Figura 5.** Situación actual del uso de proteínas animales en piensos de acuerdo con la legislación de la Unión Europea.

P: prohibición permanente; T: prohibición temporal; y A: autorizado

<sup>1</sup> Excepto como sustitutivo de leche en rumiantes no destetados

Fuente: Elaboración propia

Tabla 6. Materias primas animales autorizadas y prohibidas en alimentación animal.

Materias primas	Animales de granja (excepto peletería)			Animales de compañía y de peletería
	Rumiantes	No rumiantes	Peces	
Proteínas animales transformadas excepto la harina de sangre y la harina de pescado	NA	NA	NA <sup>1</sup>	A
Harina de sangre y productos sanguíneos de rumiantes	NA	NA	NA	A
Gelatina de rumiantes	NA	NA	NA	A
Proteínas hidrolizadas con excepción de las derivadas de no rumiantes o de pieles y cueros de rumiantes	NA	NA	NA	A
Harina de sangre de no rumiantes	NA	NA	A	A
Productos sanguíneos de no rumiantes	NA	A	A	A
Harina de pescado	NA <sup>2</sup>	A	A	A
Fosfato dicálcico y tricálcico de origen animal	NA	A	A	A
Proteínas hidrolizadas de no rumiantes o de pieles y cueros de rumiantes	A	A	A	A
Gelatina de no rumiantes	A	A	A	A
Huevos, ovoproductos, leche, lácteos, calostro	A	A	A	A
Proteínas animales distintas de las mencionadas	NA	A	A	A

A: autorizado; NA: No autorizado

<sup>1</sup> se autorizan las proteínas animales transformadas procedentes de animales no rumiantes y los piensos que las contienen para alimentar animales de la acuicultura

<sup>2</sup> se autorizan los sustitutivos de la leche que contienen harina de pescado y están destinados exclusivamente a la alimentación de rumiantes no destetados

Fuente: Adaptada de la Segunda hoja de ruta contra las EET (Comisión Europea, 2010)

## II.2.2. TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA DETERMINAR EL ORIGEN DE LOS PIENSOS

En el ámbito de la lucha contra las Encefalopatías Espongiformes Transmisibles (EETs), la prohibición de la Unión Europea (UE) de alimentar a rumiantes y otros animales de abasto con proteínas animales ha potenciado el desarrollo de diversas técnicas analíticas que permitan la correcta identificación de todos los componentes presentes en los piensos. A continuación, se describen las principales técnicas aplicadas actualmente a la identificación del origen de las materias primas e ingredientes empleados en la formulación de los piensos.

### II.2.2.1. MICROSCOPIA ÓPTICA

El método de microscopía óptica permite detectar la presencia de componentes de origen animal sobre la base de unas características típicas microscópicamente identificables, como las fibras musculares, cartílagos, huesos, cuernos, pelos, plumas o escamas de pescado. En la actualidad, el análisis microscópico constituye, junto con la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), el método oficial de la Unión Europea para comprobar la presencia de componentes de origen animal en piensos (con un límite de detección de al menos un 0,1 %), de acuerdo al Reglamento UE 51/2013 de la Comisión, de 16 de enero de 2013 (DOUE de 23 de enero de 2013), por el que se modifica el Reglamento CE 152/2009 en lo que respecta a los métodos de análisis para la determinación de componentes de origen animal con fines de control oficial de los piensos. No obstante, hasta la publicación de este último reglamento, la normativa europea ha ido experimentado sucesivas modificaciones, reflejo de los avances y mejoras acaecidas en las últimas dos décadas. A continuación se describen brevemente los avances referidos al análisis microscópico.

La publicación de la Directiva 98/88/CE de la Comisión, de 13 de noviembre de 1998 (DOCE de 27 de noviembre de 1998), sobre la identificación de los componentes de origen animal y el cálculo de sus cantidades mediante microscopio a los efectos del control oficial de los piensos, estableció por primera vez el análisis microscópico como el único método oficial para comprobar la presencia de proteínas animales en piensos. Para llevar a cabo el análisis microscópico de un pienso, se procesan al menos 50 g de la muestra molida, de la que se toman dos porciones representativas: (1) las fracciones del tamiz y (2) el sedimento concentrado que se obtiene a través de un proceso de sedimentación con tetracloroetileno. Posteriormente, ambas partes se tamizan y las fracciones obtenidas se observan con una lupa binocular y con el microscopio compuesto, para comprobar la presencia de componentes de origen animal. Algunos estudios comparativos sobre la determinación de proteínas animales transformadas en piensos, como los llevados a cabo por Gizzi y col. (2003b) y van Raamsdonk y van der Voet (2003), demostraron que las variaciones en el tiempo de sedimentación, la cantidad de muestra analizada, así como los agentes y equipos de concentración empleados en los exámenes microscópicos establecidos en la Directiva 98/88/CE, producían diferencias significativas en cuanto a la sensibilidad, especificidad y precisión

del método microscópico. Por ello, la Unión Europea derogó la Directiva 98/88/CE y aprobó la Directiva 2003/126/CE, de 23 de diciembre de 2003 (DOUE de 24 de diciembre de 2003), relativa a los métodos de análisis para determinar los componentes de origen animal a los efectos del control oficial de los piensos.

En los años posteriores, la Comisión Europea financió una serie de proyectos de investigación como STRATFEED (G6RD-2000-CT-00414) y SAFEED-PAP (FOOD-CT-2006-036221), cuyo objetivo era la armonización y mejora de la eficacia del método oficial de microscopía óptica, así como la elaboración y validación de nuevas metodologías basadas en técnicas alternativas rápidas que permitieran la diferenciación de especies y la cuantificación fiable de la presencia de harinas cárnico-óseas. En lo referente al análisis por microscopía óptica, existe una extensa bibliografía de trabajos publicados en el marco de ambos proyectos europeos (Boix y col., 2004; Gizzi y col., 2004; van Raamsdonk y col., 2004; von Holst y col., 2004; Ingravalle y col., 2007; Pinotti y col., 2007; Lai y col., 2008; Woodgate y col., 2009; Liu y col., 2011). La publicación del Reglamento CE 152/2009 de la Comisión, de 27 de enero de 2009 (DOUE de 26 de febrero de 2009), por el que se establecen los métodos de muestreo y análisis para el control oficial de los piensos, reunió en un único reglamento los diferentes métodos de análisis comunitarios para el control oficial de los piensos. Así, el texto de la Directiva 2003/126/CE se incorporó en el anexo VI de dicho Reglamento CE 152/2009, en el que se recogen las condiciones para la detección, identificación o estimación microscópica de los componentes de origen animal presentes en los piensos.

En los últimos años, el Laboratorio Comunitario de Referencia para las Proteínas Animales en los piensos (EURL-AP, *European Union Reference Laboratory for Animal Proteins in feedingstuffs*, CRA-W, *Centre Wallon de Recherches Agronomiques*, Bélgica), en colaboración con la Asociación Internacional para el Análisis de Piensos (*International Association for Feedingstuff Analysis*, IAG, Países Bajos), ha llevado a cabo diversos estudios interlaboratoriales para establecer la precisión y reproducibilidad del análisis microscópico según el anexo VI del Reglamento CE 152/2009. Los resultados de estos estudios demostraron la capacidad de dicho análisis para detectar pequeños porcentajes de harinas animales en piensos, si bien evidenciaron algunas limitaciones del método referidas a su especificidad en la detección de partículas animales de pescado, y a la imposibilidad de cuantificar con un grado suficiente de precisión los componentes de origen animal presentes en los piensos. Los resultados obtenidos por van Raamsdonk y col. (2010) permitieron la detección y diferenciación de un 0,05 % de harinas de animales terrestres en muestras que contenían un 2 % de harinas de pescado. Asimismo, Veys y col. (2010) demostraron la capacidad del análisis microscópico para detectar hasta 0,0025 % de harinas de carne y huesos en piensos en ausencia de harinas de pescado, con una incidencia de falsos negativos menor a un 5 %. Con el fin de mejorar la diferenciación entre partículas de animales terrestres y de pescado, Veys y col. (2011) realizaron un estudio interlaboratorial basado en un protocolo modificado del método microscópico para el análisis de componentes animales en piensos. Para ello, analizaron muestras de piensos vegetales que contenían 0, 0,005 y 0,1 % de harinas

de carne y huesos, así como una muestra que contenía 0,5 % de harina de salmón. Los resultados obtenidos demostraron la capacidad del método para detectar hasta 0,005 % de harinas de carne y huesos en las muestras analizadas, permitiendo así su validación. Sin embargo, no siempre resultó posible la correcta diferenciación de las partículas de pescado en la muestra que contenía harina de salmón. Por su parte, los resultados del estudio comparativo realizado por van Raamsdonk y col. (2011) revelaron que sólo una minoría de los laboratorios participantes realizó una correcta identificación de muestras de pienso con harina de plumas. De forma similar, un estudio llevado a cabo por Veys y col. (2012) concluyó que la sensibilidad del examen microscópico disminuía considerablemente cuando se analizaban muestras con harina hidrolizada de plumas. Otros trabajos recientes también han evidenciado problemas a la hora de diferenciar las partículas procedentes de pescado de las de origen animal (van Raamsdonk y col., 2012; Veys y Berben, 2013).

Las conclusiones de todos estos estudios determinaron que la Unión Europea sustituyera el anexo VI del Reglamento CE 152/2009 por el nuevo Reglamento UE 51/2013 de la Comisión, de 16 de enero de 2013, por el que se modifica el Reglamento CE 152/2009 en lo que respecta a los métodos de análisis para la determinación de componentes de origen animal con fines de control oficial de los piensos (DOUE de 23 de enero de 2013). El nuevo reglamento en vigor establece cambios con respecto al método clásico de microscopía óptica y aprueba un nuevo método de detección de componentes de origen animal basado en la PCR en tiempo real (apartado II.2.2.4.2.). Las modificaciones introducidas relativas al método de microscopía se centran en la optimización de ciertos parámetros para armonizar su aplicabilidad, así como para mejorar su sensibilidad y especificidad (Veys y col., 2011). Con relación a los cambios que afectan al protocolo, cabe señalar aspectos como: a) el uso de un embudo de decantación cónico provisto de un grifo de cierre de teflón o esmerilada en la base del cono; b) la transferencia de una porción de material inicial de 10 g para la extracción y preparación del sedimento; c) la preparación de los portaobjetos de microscopía, a partir del sedimento y, en función de la elección del analista, bien a partir del sobrenadante o de la materia prima; d) la utilización de resinas para la preparación permanente de los portaobjetos; y f) la supresión de la obligación del uso de lupa binocular de mínimo cuarenta aumentos.

Asimismo, en el Reglamento UE 51/2013 se incorporan los procedimientos normalizados de trabajo (PNT) establecidos por el EURL-AP y publicados en su sitio web (<http://eurl.craw.eu/>). En el nuevo reglamento se incluyen también otros aspectos tales como: a) una descripción detallada de los protocolos de observación en dos diagramas de flujo, uno para la harina pura de pescado y otro para aquel material distinto de la harina de pescado; b) la realización de una determinación complementaria, si tras una primera determinación llevada a cabo de conformidad con los protocolos de observación establecidos, el número total de partículas animales detectadas oscila entre 1 y 5; c) la restricción del método a una detección cualitativa, es decir, a detectar presencia/ausencia y no a estimar la cantidad de componentes

animales; y d) la armonización en la expresión de los resultados, estableciendo como límite de detección 5 partículas derivadas de animales terrestres o de pescado como promedio por determinación.

Van Raamsdonk y col. (2013) realizaron un estudio interlaboratorial con el fin de evaluar la eficacia de las disposiciones recogidas en el nuevo Reglamento UE 51/2013. Los resultados obtenidos por los participantes fueron exitosos para la mayoría de las medidas adoptadas en el nuevo reglamento, aunque ciertos aspectos como la cantidad de sedimento a analizar o el examen a partir del sobrenadante o de la materia prima de la muestra, presentaron variaciones significativas en función del laboratorio implicado en el análisis, y requieren mejoras futuras para la correcta validación e implantación del método.

Recientemente, Nesic y col. (2014) publicaron los resultados de un estudio en el que se comparaba la aplicación de la microscopía óptica según el Reglamento UE 51/2013 y una técnica de PCR convencional con cebadores especie-específicos (apartado II.2.2.4.1.), para detectar la presencia de vaca, aves, cerdo y pescado tratadas a 133 °C, 3 bares de presión y 20 minutos en piensos que contenían 1, 5, 10, 20, 50 y 100 g/kg de harinas de estas especies. Los resultados obtenidos con ambas técnicas fueron adecuados, pero la sensibilidad del método de microscopía óptica resultó más elevada, permitiendo la detección de hasta 1 g/kg (0,1 %) de harinas animales en las muestras de pienso analizadas.

Recientemente, Veys y col. (2014) publicaron los resultados de un estudio interlaboratorial basado en el nuevo protocolo de microscopía óptica para la detección de proteína animal según el Reglamento UE 51/2013. Los resultados obtenidos fueron exitosos para la mayoría de los laboratorios participantes, obteniendo un límite de detección del 0,1 % de proteína animal procesada. No obstante, la correcta identificación de harina hidrolizada de plumas fue posible sólo en el 22 % de los casos, evidenciando la limitación del método en la detección de dichas partículas animales.

#### **II.2.2.2. TÉCNICAS ESPECTROMÉTRICAS**

Los métodos espectrométricos son procedimientos instrumentales basados en la interacción de la radiación electromagnética con un analito para identificarlo o determinar su concentración. Las técnicas espectrométricas más utilizadas para la identificación de proteínas animales en piensos son la espectroscopia electromagnética en el infrarrojo cercano (NIRS), la microscopía-NIRS, la NIR-imagen y la espectrometría de masas.

##### **II.2.2.2.1. Espectroscopia de infrarrojo cercano (NIRS)**

La espectroscopia infrarroja (espectroscopia IR) utiliza la parte infrarroja del espectro electromagnético y se clasifica, según el tipo de radiación que analiza en: espectroscopia de reflectancia del infrarrojo cercano (NIR, *Near Infrared*), del infrarrojo medio (MIR, *Middle Infrared*) y del infrarrojo lejano (FIR, *Far Infrared*). En concreto, la espectroscopia de infrarrojo cercano (NIRS, *Near Infrared Spectroscopy*), sola o

combinada con otros métodos (microscopía e imagen), representa la técnica espectroscópica más utilizada para la detección de proteínas animales en piensos. La técnica NIRS se basa en la obtención de un espectro de reflectancia al pasar radiación a través de una muestra en la región de longitudes de onda comprendidas entre 780 y 2500 nm. Los materiales orgánicos absorben una determinada cantidad de energía en función de la naturaleza de sus enlaces moleculares. Así, el espectro obtenido reflejará la composición química del material analizado y se puede usar como “huella dactilar” en la identificación de muestras desconocidas mediante la comparación con espectros de referencia (Figura 6A).

La técnica NIRS combina la espectroscopía, la estadística y la informática para generar modelos matemáticos que relacionan la composición química con cambios de energía correspondientes al infrarrojo cercano. Así, para desarrollar aplicaciones cualitativas o cuantitativas con los datos espectroscópicos obtenidos mediante NIRS, es necesario disponer de procedimientos de calibración estandarizada y transferencia del modelo. Ello requiere; disponer de un conjunto amplio de muestras representativas de una misma población, archivar sus espectros, analizar las muestras mediante un método de referencia fiable, desarrollar las ecuaciones de calibración que relacionen los datos espectrales con los resultados del método de referencia y, finalmente, validar dichas ecuaciones con otras muestras de la misma población general, pero que no formen parte del test de calibración (Barber y col., 1990; Garrido-Varo y col., 1993). Al efectuar una calibración, se relaciona la información espectral con la información de referencia (composición química). Para ello, se utilizan diferentes alternativas quimiométricas como las que emplean el análisis de regresión, y entre las que destacan la regresión múltiple, regresión múltiple paso a paso, análisis por componentes principales (PCA, *Principal Component Analysis*) y regresión por mínimos cuadrados parciales (PLS, *Partial Least Squares*). El uso de redes neuronales artificiales (ANN, *Artificial Neural Network*) es otra técnica que se perfila con gran potencial, así como las máquinas de vectores de soporte (SVM, *Support Vector Machines*), ampliamente utilizadas para el modelado no lineal de sistemas de múltiples variables (Soldado y col., 2011; Sánchez del Rivero y col., 2013).

En los últimos años, se han desarrollado numerosas aplicaciones NIRS para evaluar la composición, autenticidad y trazabilidad de las materias primas que integran los alimentos destinados tanto a la alimentación humana como animal (Chen y col., 2013). En 1998, Garrido-Varo y Fernández demostraron, por primera vez, el potencial de la técnica NIRS para la detección y cuantificación de harinas de carne y huesos en piensos (Garrido-Varo y Fernández, 1998). En este estudio, la espectroscopia de reflectancia en el infrarrojo cercano se aplicó con éxito en el análisis de piensos que contenían entre un 0,5 y un 4 % de harinas de carne y huesos. Posteriormente, Murray y col. (2001) utilizaron el método NIRS para detectar 46 muestras de harina de pescado pura, así como noventa muestras de harina de pescado que contenían distintos porcentajes de harinas de carne y huesos (3, 6 y 9 %). Para la calibración utilizaron el análisis de



regresión por mínimos cuadrados parciales modificados (MPLS, *Modified Partial Least Squares*).

Otros estudios han puesto de manifiesto la necesidad de aumentar la colección de librerías espectrales para mejorar el poder de predicción de la técnica NIRS en el análisis de piensos compuestos. Así, Cozzolino (2002) analizó mediante esta técnica cuatrocientas muestras de alimentos para animales constituidas por raciones, suplementos proteicos animales y vegetales, suplementos energéticos y granos, utilizando MPLS para desarrollar las ecuaciones de calibración. Las absorciones a longitudes de onda de 1730-1750 nm permitieron diferenciar entre las harinas de carne y las de pescado, dada la diferente absorción de los ácidos grasos saturados e insaturados en la región del infrarrojo, característicos de cada harina.

Pérez-Marín y col. (2004) demostraron el potencial de la tecnología NIRS para la identificación de harinas animales en seiscientas muestras de piensos compuestos, incluyendo dos formas de presentación: piensos molidos y sin moler. Empleando la espectroscopia de reflectancia en el infrarrojo cercano y el sistema de discriminación por PLS, consiguieron detectar e identificar la presencia de harinas de carne y huesos, así como de harinas de aves y de pescado en los piensos analizados. En otro trabajo, estos autores analizaron más de 7000 muestras de piensos empleando como modelos de discriminación para la calibración un algoritmo de regresión mediante mínimos cuadrados parciales modificados (GLOBAL MPLS1) y un nuevo modelo conocido como algoritmo LOCAL. Cuando se compararon ambos modelos, el algoritmo LOCAL demostró ser el más adecuado, al minimizar los errores en la calibración (Pérez-Marín y col., 2005). De forma similar, emplearon los algoritmos de regresión PLS1 y PLS2 para detectar la presencia de subproductos animales en más de cuatrocientas muestras de piensos compuestos (Pérez-Marín y col., 2006).

En el marco de los proyectos de investigación R + D: STRATFEED (G6RD-2000-CT-00414) y MCYT-INIA (CAL 02-028-C2-2), se evaluó la capacidad de la tecnología NIRS para la detección e identificación de subproductos derivados de proteínas y grasas en piensos compuestos (Garrido-Varo y col., 2005). Para la detección de subproductos de proteínas animales se analizaron más de 280 muestras, utilizando como modelos de discriminación los algoritmos de regresión MPLS1 y PLS2, y para la detección de subproductos de las grasas, se analizaron más de 77 muestras empleando el algoritmo de regresión PLS2. Los resultados mostraron la capacidad de la espectroscopia en el infrarrojo cercano para la detección tanto de proteínas como de grasas de origen animal en piensos.

De la Haba y col. (2007, 2009) utilizaron la tecnología NIRS en el análisis de muestras de harinas animales utilizando como modelos de discriminación algoritmos de regresión PLS2. Los resultados demostraron el potencial de la técnica para detectar y cuantificar harinas de carne y huesos de aves, cerdo y vaca.

Cozzolino y col. (2009) utilizaron la espectroscopia de reflectancia en el infrarrojo cercano para discriminar muestras de harinas de pescado, carne y soja. En este trabajo se analizaron un total de 32 muestras comerciales utilizando algoritmos de regresión por PLS y APC. El 85,7 % de las muestras de harina de pescado y el 100 % de las muestras de carne y soja fueron correctamente clasificados usando el método de análisis discriminante PLS.

Soldado y col. (2011) desarrollaron un protocolo basado en la tecnología NIRS para detectar la presencia de harinas animales en piensos compuestos. Para ello, evaluaron dos estrategias quimiométricas: un método lineal modificado basado en PLS y un método de análisis no lineal basado en SVM. Cuando se compararon ambas estrategias en una validación externa utilizando muestras de referencia con un contenido de harinas animales entre el 0,05 y 4 %, el método SVM fue el más adecuado al presentar el porcentaje más bajo de clasificación errónea (0 %).

Lü y col. (2013) evaluaron el potencial de la espectroscopia generalizada de correlación bidimensional (2DCOS, *Two-Dimensional Correlation Spectroscopy*) para diferenciar cuarenta muestras de harinas procedentes de pescado y de carne y huesos. Los resultados obtenidos con el método 2DCOS demostraron que las distintas absorciones en el espectro de infrarrojo de las harinas de pescado y de carne, producidas por cambios en la temperatura, permitieron su diferenciación.

Lv y col. (2013) utilizaron el análisis NIRS y la técnica de PCR en tiempo real (apartado II.2.2.4.2.) para estimar el contenido de harinas de pescado en piensos compuestos. Para ello, analizaron 126 muestras de pienso que contenían entre un 5-15 % de harinas de pescado en una matriz vegetal. Para el examen NIRS emplearon el algoritmo de regresión PLS1 y validación cruzada. Aunque la técnica NIRS demostró su capacidad para estimar la concentración de las harinas de pescado analizadas, la técnica de PCR en tiempo real proporcionó resultados de cuantificación más precisos.

La metodología NIRS ha demostrado su capacidad para identificar de forma rápida y precisa diferentes componentes de origen animal en piensos compuestos. Esta metodología se caracteriza por ser no destructiva, disminuir el error del operador, no utilizar reactivos químicos y requerir menos mano de obra que los métodos tradicionales empleados en el laboratorio. No obstante, esta técnica requiere el manejo de equipos complejos que precisan análisis de calibración exhaustivos, y supone un alto esfuerzo de inversión inicial debido al elevado coste de los equipos. Además, los errores predictivos no son lo suficientemente bajos como para que esta tecnología pueda utilizarse como método oficial de detección de harinas animales en piensos a niveles del 0,1 % (Riccioli, 2012). En este sentido, el uso combinado de la metodología NIRS con el análisis microscópico (NIRM, *Near Infrared Microscopy*) o con sistemas de visualización espacial (NIR-CI, *Near Infrared-Chemical Imaging*), podrían añadir nuevas dimensiones a la aproximación NIRS clásica (van Raamsdonk y col., 2007; Gizzi y col., 2003a). La tecnología NIRS puede emplearse como una técnica preliminar de cribado para la

detección de harinas de carne y huesos, confirmándose posteriormente las muestras sospechosas por métodos más específicos (Riccioli, 2012).

#### **II.2.2.2.2. Microscopía-NIRS (NIRM)**

La microscopía-NIRS comenzó a desarrollarse en aplicaciones farmacéuticas para el reconocimiento de ingredientes, extendiéndose después a otros campos analíticos, incluyendo la detección de harinas animales en piensos (Garrido-Varo y col., 2003). La tecnología NIRM utiliza un espectrómetro NIR clásico acoplado a un microscopio óptico. El microscopio incluye una cámara y un sistema de visión que magnifica la imagen de la muestra y permite dirigir el haz infrarrojo a cada una de las partículas del pienso a analizar, obteniéndose información espectral de todas las partículas microscópicas que lo integran. Las partículas presentes en el pienso pueden ser identificadas mediante comparación con librerías espectrales de referencia, desarrollando previamente un análisis discriminante con la apropiada herramienta quimiométrica. Aunque el método NIRM sigue el mismo principio que el análisis por microscopía óptica, el acoplamiento de ambas tecnologías permite sustituir la opinión subjetiva del analista por el espectro característico de cada elemento analizado. Esta aproximación hace posible la identificación de harinas animales en piensos compuestos de una forma objetiva, rápida, precisa y sensible (Abbas y col., 2010a; Yang y col., 2011; Boix y col., 2012) (Figura 6B).

Las primeras aplicaciones de la técnica NIRM para la detección de harinas de carne y huesos en piensos corresponden a Piraux y Dardenne (1999) y a Baeten y col. (2001), quienes emplearon con éxito un microscopio acoplado a un equipo de reflectancia infrarroja de transformada de Fourier (FT-NIR) en el análisis de diferentes materiales animales y vegetales, incluyendo harinas de carne y huesos.

Baeten y col. (2005) evaluaron el potencial de la técnica NIRM para detectar harinas de carne y huesos a partir del análisis del sedimento concentrado de más de 250 muestras de piensos. Este trabajo tenía por objetivo mejorar la eficacia del método de sedimentación, así como evaluar la aplicabilidad de dos modelos discriminantes para llevar a cabo la detección de las harinas: el algoritmo PLS y el criterio de discriminación basado en los valores de absorbancia a diferentes longitudes de onda. En lo referente al método de sedimentación, los resultados obtenidos mostraron que el protocolo que empleaba una mezcla de tetracloroetileno (TCE) y tetrabromoetileno (TBE) como agentes de concentración, permitía obtener una mayor cantidad de sedimento. Además, los resultados de este estudio demostraron que el sistema de discriminación por PLS era el más adecuado, permitiendo la detección precisa de hasta un 0,05 % de harinas animales.

De la Roza-Delgado y col. (2007) publicaron los resultados obtenidos en un trabajo basado en el análisis NIRM enfocado a la detección de harinas de carne y huesos en piensos a partir de muestras sin sedimentar. Para la validación del ensayo, se analizaron veinticuatro muestras de pienso compuesto mediante microscopía de reflectancia

infrarroja de transformada de Fourier (FT-NIR). Este trabajo permitió detectar hasta un 0,02 % de harinas animales en piensos compuestos.

Von Holst y col. (2008) desarrollaron un estudio para evaluar la posible transferencia de un nuevo protocolo de análisis por microscopía FT-NIR elaborado por el *Walloon Agricultural Research Centre* (CRA-W, Bélgica) a dos laboratorios independientes de la Unión Europea, el *Institute for Health and Consumer Protection* (IHCP, Italia) y el *Institute for Reference Materials and Measurements* (IRMM, Bélgica). Para ello, se analizó el sedimento concentrado de veinte muestras de piensos que contenían entre un 0,5-8 % de harinas de carne y huesos. Los resultados obtenidos por los dos laboratorios que participaron en el análisis fueron similares, demostrando la reproducibilidad y la posibilidad de transferencia interlaboratorial de las ecuaciones de calibración obtenidas para detectar harinas de carne y huesos en piensos.

Pérez-Marín y col. (2009) emplearon una metodología basada en la microscopia-NIRS, métodos quimiométricos, y una librería espectral creada con 158 muestras de ingredientes puros de subproductos animales, para la identificación del origen de diferentes subproductos animales en mezclas y piensos compuestos. Para ello, desarrollaron y evaluaron varios modelos discriminantes de clasificación mediante una aproximación en dos fases. En la primera fase se identificaron partículas animales utilizando dos estrategias, SIMCA (*Soft Independent Modeling of Class Analogy*) y el método de los k vecinos más próximos (KNN, *K Nearest Neighbours*) y, en la segunda, se empleó el algoritmo KNN para diferenciar entre partículas procedentes de animales terrestres y de pescados. Los resultados obtenidos mostraron que el modelo KNN, tras aplicar la segunda derivada en los espectros, permitió la correcta clasificación del 98,5 % de las partículas analizadas. Además, se evaluó la metodología desarrollada utilizando un colectivo de validación externa de cuarenta muestras, de las cuales, veinte correspondían a mezclas experimentales de harina bovina (2,5-16 %) en harinas de pescado, mientras que las veinte restantes eran piensos compuestos comerciales con harinas de pescado (2,5-3 %), harinas de carne y huesos de animales terrestres (15-30 %), o piensos vegetales sin adulterar. Los resultados demostraron la capacidad de la metodología desarrollada para la detección de harinas animales en mezclas y piensos compuestos. Sin embargo, no fue posible la diferenciación entre las partículas procedentes de animales terrestres y las de pescado en las muestras de pienso compuesto.

Fernández-Ibáñez y col. (2010) crearon una biblioteca espectral con veintiseis ingredientes de uso frecuente en piensos y cuatro ingredientes prohibidos (harinas de carne y huesos, sangre, hemoglobina y plasma animal), para la identificación de ingredientes animales y vegetales en mezclas complejas mediante una técnica NIRM previamente descrita por Fernández-Ibáñez y col. (2008). Los resultados obtenidos mostraron que la biblioteca espectral era una herramienta útil para la identificación y diferenciación de los ingredientes puros. Sin embargo, los espectros generados al

analizar las mezclas no coincidieron con los procedentes del análisis de dichos componentes puros.

Fumière y col. (2010b) combinaron la microscopía de reflectancia infrarroja de transformada de Fourier y una técnica de PCR en tiempo real, para detectar hasta un 5 % de harinas de carne y huesos de pollo, cerdo y vaca procedentes de la Asociación Europea de Industrias Transformadoras de Grasas (EFPPA, *European Fat Processors and Renderers Association*, Bélgica) en mezclas que contenían pequeños porcentajes de ingredientes autorizados (sangre, huevos o leche). En este trabajo también se evaluó la aplicabilidad de tres procedimientos de limpieza de las partículas detectadas con el método NIRM, para eliminar el ADN inespecífico procedente de los ingredientes autorizados: *DNA Erase* (MP Biomedical, Solon, Ohio, USA), *RBS* (Chemical Products R. Borghgraef, Bruselas, Bélgica) y la combinación de peróxido de hidrógeno, acetona e isopropanol. Si bien el protocolo *DNA Erase* resultó ser el más eficiente, la eliminación del ADN inespecífico también redujo la concentración de ADN procedente de las partículas de carne y huesos, influyendo por tanto en los resultados obtenidos. No obstante, los resultados del estudio concluyeron que la combinación de ambos ensayos (microscopía-NIRS y PCR en tiempo real) constituye una estrategia útil para determinar el origen animal de todas las harinas analizadas.

Pavino y col. (2010) evaluaron la aplicabilidad de la microscopía-NIRS mediante escaneo automatizado para la detección de fragmentos óseos procedentes de harinas de carne y huesos a partir del sedimento concentrado de muestras de pienso. Para ello, analizaron 356 muestras de ingredientes vegetales, minerales y harinas animales procedentes de vaca, cerdo, aves y pescado, así como piensos comerciales que contenían de 0,05 a 0,5 % de harinas de estas especies. Los resultados obtenidos mostraron la capacidad de la técnica para detectar hasta un 0,1 % de harina de vaca, cerdo, aves y pescado en las muestras analizadas.

Boix y col. (2012) publicaron los resultados de un estudio realizado en colaboración con siete laboratorios internacionales para evaluar la aplicabilidad de la metodología NIRM en la detección cualitativa de partículas animales en piensos compuestos. Los resultados obtenidos fueron similares en todos los laboratorios participantes, demostrando la reproducibilidad de la técnica NIRM y su capacidad para detectar hasta un 0,1 % de harinas de carne y huesos a partir del sedimento de los piensos analizados. En el marco de este estudio, Fernández Pierna y col. (2013) publicaron los resultados de los espectros NIRM obtenidos por ocho laboratorios empleando una célula de estandarización creada a partir de doce ingredientes animales y vegetales. Estos autores demostraron cómo utilizando procedimientos matemáticos simples es posible la creación de librerías espectrales casi idénticas procedentes de distintos instrumentos de medida y, por tanto, la transferencia de espectros entre equipos de distintos laboratorios.

Tena y col. (2014) evaluaron la influencia del contenido graso de muestras de harinas para diferenciar entre material procedente de animales terrestres y pescados. El

método NIRM permitió clasificar correctamente ambos grupos animales en aquellas muestras desgrasadas con tratamientos mediante solvente no polares. Sin embargo, los resultados obtenidos demostraron que el contenido de ácidos grasos poliinsaturados, superior en las harinas de pescado, es un factor que influye en la diferenciación, dadas las distintas absorciones en el espectro de infrarrojo de ambos tipos de grasas (animales y de pescado). Por ello, el empleo de esta técnica en la diferenciación de harinas de pescado y animales terrestres en muestras desgrasadas está limitado.

La microscopía-NIRS permite detectar la presencia de pequeños porcentajes de harina de carne y huesos en los piensos. No obstante, para un nivel de detección del 0,1 %, el tiempo de análisis es superior a tres días, lo que limita la aplicabilidad de la técnica en las pruebas rutinarias. En los últimos años, el desarrollo de nuevas tecnologías como los sensores hiperespectrales que combinan el uso de la imagen y la espectroscopia, han conseguido mejorar esta limitación (Yang y col., 2011; Riccioli, 2012).

#### II.2.2.2.3. NIR-imagen (NIR-CI)

La combinación de la espectroscopia infrarroja tradicional con las propiedades de las imágenes microscópicas y macroscópicas ha permitido el desarrollo de nuevos métodos aplicados al control de autenticidad de alimentos y piensos que ofrecen simultáneamente información espectral y espacial. El conjunto de estos métodos se define como "Imagen Química" (*Chemical Imaging*, CI). El uso de imágenes químicas es un nuevo enfoque analítico que permite identificar la composición química en las muestras y, además, conocer su distribución espacial. En términos sencillos, se puede asemejar a un "mapa químico" de la muestra, ya que un instrumento NIR-imagen típico puede recoger simultáneamente miles de espectros espacialmente distintos, almacenando los datos en forma de matrices hiperespectrales. Cada espectro de la matriz corresponde a un píxel, es decir, a un punto espacialmente distinto de los otros. La posibilidad de registrar un espectro en un amplio intervalo de longitudes de onda para cada píxel de la imagen de una muestra, está permitiendo el desarrollo de nuevas metodologías de gran utilidad en la identificación y autenticación de alimentos y piensos animales (Garrido-Varo y col., 1993; Bautista, 2009; Dale y col., 2012) (Figura 6C).

La primera aplicación de esta técnica para la detección de harinas de carne y huesos en piensos corresponde a Fernández Pierna y col. (2004). Estos autores realizaron un estudio comparativo para evaluar la aplicabilidad de las máquinas de vectores de soporte (SVM, *Support Vector Machines*), los algoritmos de regresión mediante mínimos cuadrados parciales (PLS, *Partial Least Squares*) y la red neuronal artificial (ANN, *Artificial Neural Network*) para clasificar las partículas detectadas en los piensos mediante la técnica NIR-imagen. Los resultados confirmaron la utilidad de la tecnología NIR-imagen combinada con técnicas de modelado no lineal en la detección de harinas de carne y huesos en piensos. En concreto, los modelos SVM fueron más exactos que los modelos PLS y ANN.

Fernández Pierna y col. (2010) llevaron a cabo la validación de una técnica de NIR-imagen que utilizaba el método SVM, para detectar la presencia de proteínas animales transformadas en piensos compuestos. Para ello, analizaron 76 muestras evaluadas en varios estudios interlaboratoriales previos llevados a cabo por el *Directorate General for Health and Consumers* (DG SANCO, Bélgica), el *Walloon Agricultural Research Centre* (CRA-W, Bélgica), la *Veterinary Laboratories Agency* (VLA, Inglaterra) y la *International Association for Feedingstuff Analysis* (IAG, Países Bajos). Los resultados obtenidos demostraron la capacidad del ensayo para detectar hasta un 0,1 % de harinas de carne y huesos en los piensos analizados.

Nansen y col. (2010) optimizaron la metodología NIR-imagen para la adquisición de imágenes hiperespectrales, y la aplicaron a la identificación de harinas de carne y huesos en piensos compuestos. Para ello, analizaron muestras de mezclas complejas que contenían entre un 0 y un 25 % de harinas de carne y huesos en cuatro matrices diferentes, mediante un algoritmo de discriminación lineal (LDA, *Linear Discriminant Algorithm*) en un rango espectral entre 418-892 nm. Este trabajo permitió la detección precisa de hasta un 1 % de harinas animales en piensos.

Abbas y col. (2010b) utilizaron también la técnica de NIR-imagen y los modelos SVM para la detección, diferenciación y cuantificación de harinas de carne y huesos en piensos compuestos. Esta tecnología permitió la detección de hasta un 0,1 % de las harinas y la diferenciación entre las harinas de pescado y de otras especies animales, demostrando la aplicabilidad de la técnica NIR-imagen para el análisis rutinario de los piensos.

Riccioli y col. (2011) aplicaron la metodología de NIR-imagen para la diferenciación de harinas de animales terrestres y harinas de pescado utilizadas en la elaboración de los piensos. Para la selección de los píxeles representativos, se evaluaron cuatro algoritmos matemáticos (distancia de Mahalanobis, Kennard-Stone, interpolación espacial, y proceso de Binning), y se desarrollaron modelos predictivos por PLS. En este trabajo se analizaron 135 muestras de harinas animales procesadas, incluyendo un grupo de validación externa de 45 muestras. Los resultados obtenidos mostraron la capacidad discriminatoria de la combinación imagen-NIR para diferenciar entre harinas de animales terrestres y harinas de pescado. Los mejores resultados se obtuvieron utilizando la interpolación espacial como método de selección de píxeles representativos, alcanzando un poder discriminatorio cercano al 100 %.

#### **II.2.2.2.4. Espectrometría de masas (MS)**

La espectrometría de masas (MS, *Mass Spectrometry*) se basa en la posibilidad de separar especies moleculares y atómicas según su relación masa-carga. Para ello es necesario ionizar las moléculas de interés con un haz de electrones de alta energía y obtener los iones formados en fase gaseosa. Los iones generados son acelerados hacia un analizador y separados en función de su relación masa-carga, llegando finalmente a un detector donde producen una señal eléctrica que es procesada, ampliada y enviada a un

ordenador. El patrón de fragmentación resultante, así como los iones residuales, constituyen el espectro de masas. En principio, el espectro de masas de cada compuesto es único y puede ser utilizado para caracterizar el analito.

Para la identificación de proteínas animales en piensos se pueden utilizar diversas técnicas, entre las que destacan la espectrometría de masas de cuadrupolo tiempo de vuelo (Q-TOF-MS, *Quadrupole Time-Of-Flight Mass Spectrometry*) y la espectrometría de masas de tiempo de vuelo por desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI-TOF-MS, *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry*), dependiendo del grado de resolución que se desee obtener.

Buckley y col. (2008) emplearon la técnica de MALDI-TOF-MS para detectar e identificar la presencia de restos óseos de vaca, oveja y cerdo en harinas de carne y huesos. Para ello, aislaron el telopéptido carboxi terminal de la cadena  $\alpha 2$  del colágeno tipo I mediante una digestión con una colagenasa bacteriana. Posteriormente, Buckley y col. (2009) evaluaron el potencial de otros marcadores peptídicos derivados del colágeno, obtenidos a partir de una digestión con tripsina, para la identificación de especies animales en harinas de carne y huesos. El análisis mediante MALDI-TOF-MS de los marcadores seleccionados permitió identificar la presencia de huesos procedentes de oveja y cabra, vaca, aves, y cerdo en las harinas de carne y huesos analizadas.

En los últimos años, el acoplamiento de un detector de espectrometría de masas a un sistema de separación cromatográfica constituye una herramienta que permite aumentar la sensibilidad y la especificidad de los métodos de análisis. Las técnicas cromatográficas se basan en la separación de las proteínas atendiendo a su polaridad, es decir, a su distribución entre una fase móvil polar y una fase orgánica que está fija a una matriz (Ashoor y col., 1988). Von Holst y col. (2009) desarrollaron y validaron una técnica de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS, *Gas Chromatography-Mass Spectrometry*) o a un detector de ionización en llama (GC-FID, *Gas Chromatography-Flame Ionization Detector*), para detectar y cuantificar la presencia de triheptanoato de glicerol (GTH) (marcador de los subproductos animales de la categoría 1 y 2) en harinas de carne y huesos, así como en grasas animales. El límite de cuantificación del GTH en las harinas y grasas analizadas fue de 2 mg/kg. Esta metodología ha sido validada por varios estudios interlaboratoriales (Boix y col., 2010; Marchis y col., 2013).

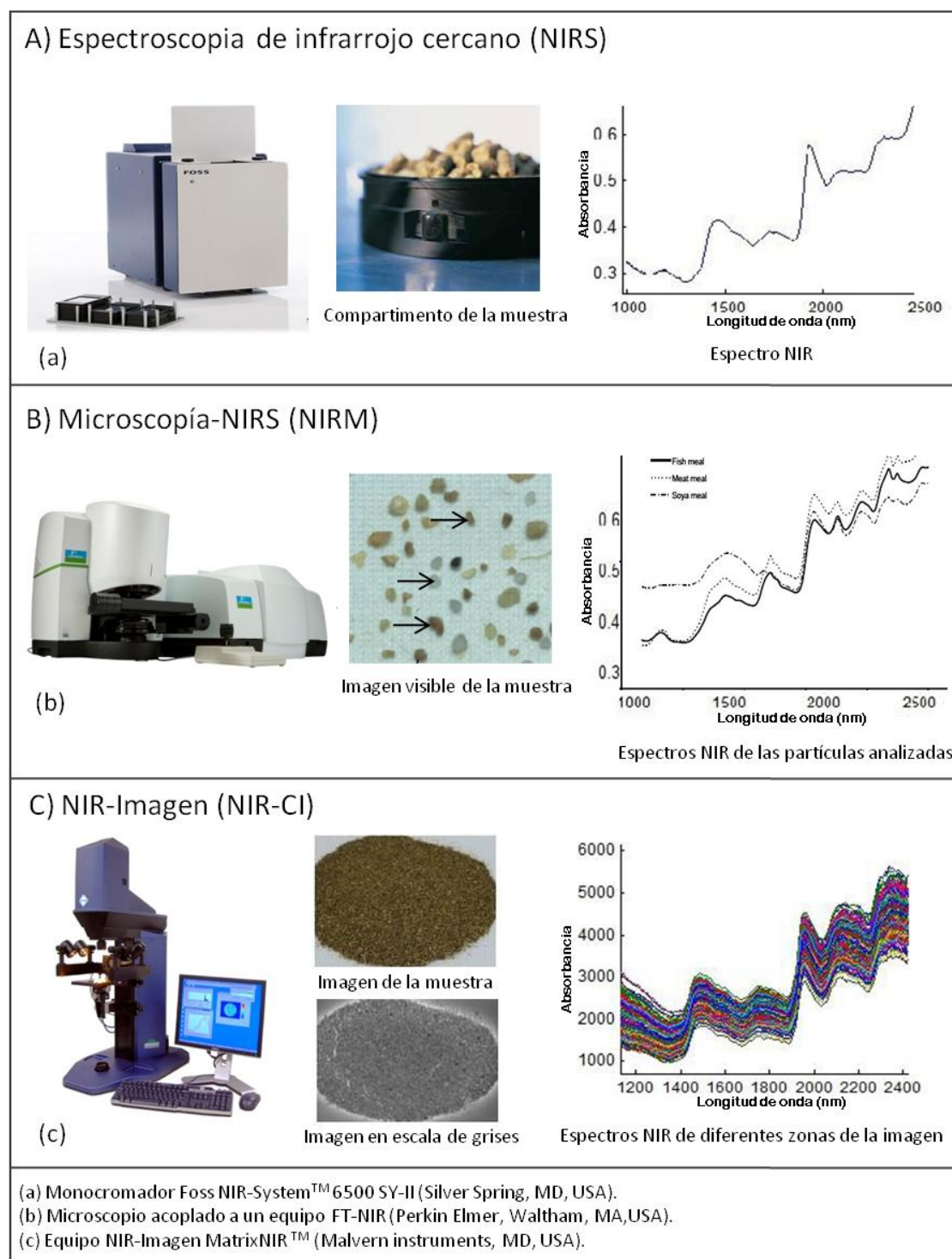
Balitz y col. (2011) utilizaron las técnicas de MALDI-TOF-MS y Q-TOF-MS de alta resolución para detectar el marcador osteocalcina en harinas de carne y huesos. Los espectros de masas generados permitieron diferenciar entre harinas de carne y huesos de origen bovino y porcino, dada la diferente masa-carga que presentaban los fragmentos peptídicos de la osteocalcina digerida en cada especie.

Buckley y col. (2012) estudiaron la degradación que sufría la fracción proteica de harinas de carne y huesos sometidas a distintas temperaturas, y evaluaron el potencial de diferentes marcadores proteicos termoestables como la osteocalcina, el colágeno tipo



I y la albumina sérica, en la identificación del origen animal de los piensos mediante espectrometría de masas. Los resultados del análisis de dieciseis muestras de harinas animales constituidas por proteínas de vaca, oveja, cerdo y pollo tratadas a 133, 137, 141 y 145 °C a 3 bares de presión durante 20 minutos, evidenciaron una mayor degradación en las harinas de oveja y cerdo que en las de vaca y pollo a la temperatura de tratamiento más baja (133 °C). Por otra parte, los espectros de masas obtenidos indicaron que los marcadores más estables a los tratamientos térmicos aplicados fueron el colágeno tipo I y la albumina sérica.

La espectrometría de masas, sola o acoplada a cromatografía, ofrece ventajas frente a las otras técnicas espectrométricas: a) se puede obtener mucha información con una cantidad muy pequeña de compuesto; b) no implica absorción o emisión de luz; c) el límite de detección de esta técnica es tres órdenes de magnitud más sensible que los métodos ópticos; y d) los espectros obtenidos son más sencillos, y generalmente únicos y fácilmente interpretables. Sin embargo, también presenta inconvenientes como el elevado coste del instrumental utilizado, de dos a tres veces superior al de los instrumentos ópticos atómicos. Además, es una técnica destructiva ya que la muestra no se puede recuperar íntegra al haber sufrido la fragmentación.



**Figura 6.** Representación de los espectros obtenidos por: A) espectroscopia de infrarrojo cercano (NIRS); B) microscopía acoplada a un espectroscopio de reflectancia infrarroja; y C) NIR-imagen, a partir de una muestra de pienso compuesto.

Fuente: Dale y col. (2012); STRATFEED EU project nº G6RD-2000-CT-00414.  
<http://www.stratfeed.cra.wallonie.be>

### II.2.2.3. TÉCNICAS INMUNOLÓGICAS

Las técnicas inmunológicas son procedimientos analíticos basados en la reacción específica entre un antígeno y su correspondiente anticuerpo. La aplicación cada vez más generalizada de estas técnicas para la detección en los alimentos de constituyentes naturales, microorganismos, toxinas, *etc.*, se debe a las grandes ventajas que presentan frente a los métodos convencionales: reducción del tiempo y coste del análisis, disminución de la cantidad de muestra necesaria, utilización de instrumental poco complejo, posibilidad de semi-automatización y adaptación a kits miniaturizados. Además, su adecuada sensibilidad y especificidad las hacen especialmente útiles para el análisis rutinario de los alimentos y piensos (Asensio y col., 2008).

Las técnicas inmunoenzimáticas, caracterizadas por el empleo de marcadores enzimáticos para la detección de las interacciones antígeno-anticuerpo, constituyen en la actualidad los métodos inmunológicos más extendidos en el análisis de alimentos y piensos. En estas técnicas, uno de los elementos de la reacción (antígeno o anticuerpo) se fija a un soporte sólido, generalmente placas de poliestireno, polivinilo, polipropileno o *nylon*, que permiten su adsorción pasiva y la eliminación de los compuestos libres mediante lavado. Otros formatos emplean como fase sólida membranas, generalmente de nitrocelulosa, a las que se unen las proteínas mediante enlaces hidrofóbicos. Una vez inmovilizados los antígenos o los anticuerpos al soporte en cuestión, la interacción antígeno-anticuerpo se detecta mediante la reacción colorimétrica producida por la acción de una enzima (conjugada al antígeno o al anticuerpo) al degradar el sustrato correspondiente.

Existen diversas variantes de las técnicas inmunoenzimáticas, que se clasifican atendiendo al componente de la reacción que se fija en primer lugar, la fase sólida utilizada y si se emplean o no concentraciones limitantes de antígeno y anticuerpo. Concretamente, el ensayo de inmuoabsorción enzimática (ELISA, *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) y el inmunoensayo de flujo lateral (LFIA, *Lateral-Flow Immunoassay*) son los formatos más utilizados en el campo de la identificación de especies animales en piensos.

Chen y col. (2002 y 2004) obtuvieron anticuerpos monoclonales frente a la proteína muscular termoestable troponina I, que permitieron la detección, mediante técnicas de ELISA indirecto y ELISA *sandwich*, de hasta un 1 % de harinas de carne, entre el 0,3-2 % de harinas de mamíferos y rumiantes y entre 0,05-5 % de harinas de carne de vaca y oveja en muestras tratadas a 132 °C y 2 bares de presión durante 2 horas. Asimismo, Liu y col. (2006) detectaron la presencia de músculo esquelético de cerdo en diferentes tipos de piensos, utilizando una técnica de ELISA *sandwich* con anticuerpos monoclonales obtenidos también frente a la proteína termoestable troponina I. El límite de detección alcanzado fue del 0,05 % para las harinas de cerdo en piensos de soja, y del 1 % para las harinas de carne y huesos comerciales que contenían cerdo en cantidades desconocidas. De forma similar, Kim y col. (2004a, b y 2005) utilizaron anticuerpos monoclonales frente a una proteína termoestable del tejido muscular liso de vaca, en este caso la

proteína h-caldesmon, para la detección de harina de carne y huesos mediante ELISA. Los resultados obtenidos demostraron la capacidad de la técnica para detectar hasta un 0,05 % de harina de carne y huesos de vaca en piensos, así como para diferenciar entre las harinas de vaca y las procedentes de otras especies animales (cerdo y pollo) y vegetales (soja, cebada, maíz y arroz).

Las técnicas inmunoenzimáticas constituyen métodos analíticos sencillos y eficaces, cuyos reactivos se pueden comercializar en forma de kits miniaturizados que permiten su adaptación a pruebas de campo de fácil ejecución e interpretación. Por ello son cada vez más numerosos los laboratorios y empresas biotecnológicas que diseñan y comercializan kits basados en estas técnicas, como alternativa a otros métodos más caros y laboriosos.

Margry y col. (2005) llevaron a cabo un estudio comparativo para evaluar el potencial de tres kits inmunoenzimáticos comerciales en la detección e identificación de diferentes subproductos animales: *MELISA-TEK<sup>TM</sup>* (ELISA Technologies Inc., Gainesville, Florida, USA); *Agri-Screen<sup>®</sup>* (Neogen Corporation, Lansing, Michigan, USA); y *FeedChek<sup>TM</sup>* (Strategic Diagnostics Inc., Newark, Delaware, USA). En este estudio se analizaron más de 35 muestras de subproductos de vaca, oveja, cerdo y aves tratados a 133, 137, 141, 145 y 159 °C, así como quince muestras de piensos compuestos que contenían entre un 0,1-10 % de harinas de huesos de vaca y aves tratadas de 133 a 145 °C. Los resultados demostraron la capacidad del ensayo de ELISA para detectar hasta un 0,5 % de harinas de rumiantes, cerdo y aves, incluso en las muestras tratadas a 145 °C. De los tres kits comerciales ensayados, el *FeedChek<sup>TM</sup>* fue el que proporcionó mejores resultados en la detección de las harinas.

Fumière y col. (2009b) evaluaron la aplicabilidad del kit comercial *MELISA-TEK<sup>TM</sup>* (ELISA Technologies Inc., Gainesville, Florida, USA) para la detección de proteínas de origen rumiante en piensos. Para ello, analizaron veinticuatro muestras de proteínas procesadas de origen no rumiante, así como doce mezclas que contenían entre un 1-5 % de harina rumiante en proteína animal. Los resultados de este estudio demostraron la capacidad del kit *MELISA-TEK<sup>TM</sup>* para detectar hasta un 1 % de harinas de origen rumiante sometidas a un tratamiento térmico de 133 °C en las muestras de pienso analizadas, si bien con este kit se obtuvo un elevado porcentaje de falsos positivos. Posteriormente, Fumière y col. (2010a) desarrollaron otro estudio en colaboración con seis laboratorios para evaluar la reproducibilidad del kit comercial *MELISA-TEK<sup>TM</sup>* en la detección de proteína rumiante, registrando variaciones significativas en función del laboratorio implicado en el análisis.

En los últimos años han sido numerosos los estudios llevados a cabo para evaluar la especificidad y sensibilidad de los diferentes kits inmunoenzimáticos comerciales para la detección de proteínas animales en piensos. Los más empleados han sido los ensayos de ELISA, como el *MELISA-TEK<sup>TM</sup>* (ELISA Technologies Inc., Gainesville, Florida, USA) (Margry y col., 2005; Myers y col., 2007; Fumière y col., 2008, 2009b, 2010a; Bremer y col., 2013), y los inmunoensayos de flujo lateral como el *Reveal<sup>®</sup> for Ruminant in Feed*

(Neogen Corporation, Lansing, Michigan, USA) (Myers y col., 2005; Fumière y col., 2008), *FeedChek*<sup>TM</sup> (Strategic Diagnostics Inc., Newark, Delaware, USA) (Kwiatek y col., 2005; Margry y col., 2005; Myers y col., 2005), y *Agri-Screen*<sup>®</sup> (Neogen Corporation, Lansing, Michigan, USA) (Bellorini y col., 2005; Margry y col., 2005). Estas técnicas, basadas en el análisis de proteínas termoestables específicas de tejido, ofrecen la ventaja de permitir la detección específica del material animal prohibido y su diferenciación de ingredientes autorizados de origen animal. La aplicabilidad de estos kits ha sido evaluada por varios organismos oficiales de Europa y Estados Unidos, tales como el Laboratorio de Referencia de la UE para las Proteínas Animales en los piensos (EURL-AP, Bélgica), el *Institute for Reference Materials and Measurements* (IRMM, Bélgica), y el *US Food and Drug Administration* (FDA, USA). No obstante el límite de detección que presentaron, superior al 0,1 %, limita la aplicabilidad de las técnicas inmunoenzimáticas para el control oficial de los componentes animales en piensos (Ballin y col., 2009; Fumière y col., 2009a; Kreuz y col., 2012).

Karanam (2011) desarrolló un nuevo método de extracción proteica para mejorar la sensibilidad del kit comercial *Reveal*<sup>®</sup> *for Ruminant in Feed* (Neogen Corporation, Lansing, Michigan, USA) en el análisis de piensos animales. El método consistió en una sedimentación previa del hueso de la muestra, seguida de una digestión con EDTA, facilitando así la liberación de la fracción proteica que está unida por enlaces covalentes a la estructura mineral del hueso. Este ensayo permitió mejorar el límite de detección de la técnica de un 2 a un 0,1 % de harinas de carne y huesos de vaca en piensos.

Kreuz y col. (2012) desarrollaron una técnica de ELISA *sandwich* con anticuerpos policlonales frente a la osteocalcina bovina, empleando un método de extracción mediante EDTA. Este ensayo permitió la detección de hasta un 0,1 % de harinas de carne y huesos bovinas sometidas a tratamientos térmicos de hasta 145 °C en piensos vegetales, así como la correcta diferenciación entre harinas de vaca y harinas de pescado y de pollo. Sin embargo, los anticuerpos reconocían también las harinas de huesos procedentes de cerdo, limitando la especificidad global del ensayo.

#### II.2.2.4. TÉCNICAS GENÉTICAS

Las técnicas genéticas se basan en el reconocimiento específico de fragmentos de ácidos nucleicos presentes en los seres vivos. La molécula de ADN, cuando se compara con los marcadores proteicos, ofrece una serie de ventajas tales como el mayor grado de variabilidad genética examinado, la pequeña cantidad de muestra requerida para el análisis y la posibilidad de analizar muestras sometidas a tratamientos térmicos intensos debido a la elevada estabilidad del ADN durante dichos procesos (Pereira y col., 2008).

Las técnicas genéticas basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) son, con diferencia, las más utilizadas en el ámbito de la autenticación de especies animales en alimentos y piensos. La reacción de PCR permite obtener millones de copias de una secuencia específica de ADN mediante una simple reacción enzimática. Debido a su sencillez, especificidad y sensibilidad, los ensayos de PCR basados en el diseño de

oligonucleótidos específicos para la amplificación selectiva de fragmentos de ADN constituyen actualmente la aproximación más extendida para la identificación del origen de las materias primas que integran los piensos.

#### II.2.2.4.1. PCR convencional

La técnica de PCR convencional o PCR clásica está basada en la amplificación selectiva de fragmentos de ADN a partir de diferentes organismos, y la posterior detección de la amplificación al final de la reacción mediante migración electroforética del producto de PCR. En el ámbito del análisis de los alimentos, esta técnica se utiliza ampliamente para la autenticación de productos de origen animal como leche y productos lácteos (López-Calleja y col., 2005a, b; Mayer, 2005; Bai y col., 2009), pescado (Sezaki y col., 2005; Asensio y col., 2009; Catanese y col., 2010), y carne y productos cárnicos (Rodríguez y col., 2004a, b; di Pinto y col., 2005; Ghovvati y col., 2009; Mane y col., 2009; Bai y col., 2010; Rojas y col., 2010a, b; Hou y col., 2015). En los últimos años, a raíz de la crisis alimentaria derivada de la Encefalopatía Espongiforme Bovina (EEB) y la consecuente prohibición de las harinas cárnicas en la alimentación de los animales de abasto, la aplicación de la técnica de PCR se ha extendido de manera creciente al análisis de piensos.

La Tabla 7 resume los principales trabajos publicados sobre el empleo de la técnica de PCR convencional a la detección de componentes de origen animal en los piensos. La primera aplicación de esta técnica corresponde a Tartaglia y col. (1998). En este trabajo se diseñaron cebadores específicos de vaca en el gen que codifica la subunidad 8 de la ATPasa y la región amino-terminal de la subunidad 6 de la ATPasa. Los resultados obtenidos al emplear los cebadores en la técnica de PCR mostraron la capacidad del ensayo para detectar hasta un 0,125 % de harinas de vaca, incluso en muestras tratadas a 133 °C durante 33 minutos.

Desde la publicación del estudio de Tartaglia y col. (1998), han sido numerosos los autores que han empleado sus cebadores específicos para detectar ADN bovino en harinas y piensos destinados a la alimentación animal (Wang y col., 2000; Colgan y col., 2001; Krcmár y Rencová, 2001; Lahiff y col., 2001; Myers y col., 2001, 2006; Cheng y col., 2003; Natonek y col., 2004; Natonek-Wisniewska, 2008; Weiner y Kwiatek, 2008). Además, la aplicación de la técnica de PCR se ha extendido a la detección e identificación de otras especies animales de interés en piensos. Por ejemplo, Colgan y col. (2001) utilizaron los cebadores específicos de vaca de Tartaglia y col. (1998) y diseñaron tres parejas de cebadores específicos de oveja, cerdo y pollo en el gen que codifica la subunidad 8 de la ATPasa, para detectar la presencia de estas especies en muestras comerciales de harinas de carne y huesos. El límite de detección del ensayo fue del 0,3 % para las muestras que contenían ADN de oveja y vaca y del 1 % para las que contenían cerdo. De forma similar, Lahiff y col. (2001) diseñaron cebadores específicos de oveja, cerdo y pollo, y los emplearon junto con los cebadores específicos de vaca diseñados por Tartaglia y col. (1998) para detectar mediante PCR la presencia de estas especies en harinas animales tratadas a 133 °C durante 20 minutos.

**Tabla 7.** Principales trabajos sobre la aplicación de la técnica de PCR convencional para la detección e identificación de componentes de origen animal en piensos.

Especies	Marcador genético	Límite de detección	Referencia
V	<i>ATPasa6 y 8</i>	<b>0,125 %</b> HCH de vaca	Tartaglia y col. (1998)
V, O, C y P	<i>ATPasa8</i>	<b>0,3 %</b> ADN de oveja y vaca y <b>1 %</b> de cerdo	Colgan y col. (2001)
V, O, C y P	ADN mitocondrial	<b>1 %</b> HCH de vaca y cerdo y <b>5 %</b> de oveja y pollo	Lahiff y col. (2001)
V	satélite bovino 1709	<b>1 %</b> HCH de vaca	Calvo y col. (2002)
R, S y A	SINE (Art2, PRE-1) y LINE (CR1)	<b>0,01 %</b> HCH de vaca	Tajima y col. (2002)
R, C y A	<i>12S ARNr</i>	<b>0,125 %</b> HCH de vaca, oveja, cerdo y pollo y <b>0,5%</b> de cabra	Bellagamba y col. (2003)
Vertebrados	<i>16S ARNr</i>	<b>0,06 %</b> harinas de pescado	Bottero y col. (2003a, b)
V	<i>lactoferrina</i>	<b>0,02 %</b> HCH de vaca	Gao y col. (2003)
V, O, C y P	<i>ARNt<sup>lys</sup></i> , <i>ATPasa6 y 8</i>	<b>0,01 %</b> HCH de las especies diana	Krcmár y Rencová (2003)
R, CB y C	<i>COII</i> y <i>ARNt<sup>lys</sup></i>	<b>2 %</b> HCH de vaca y <b>10 %</b> harinas de sangre de cerdo	Myers y col. (2003)
R, C, A y PD	<i>12S</i> , <i>16S ARNr</i> y <i>ARNt<sup>val</sup></i>	<b>0,004 %</b> ADN de pescado y <b>0,002 %</b> resto de las especies	Dalmasso y col. (2004)
Perro	D-loop	<b>0,05 %</b> ADN de perro	Gao y col. (2004)
V, M, R, O y CBR	<i>ATPasa8</i>	<b>0,01-0,1 %</b> HCH de vaca (vaca, mamíferos y rumiantes)	Kusama y col. (2004)
V	<i>cytB</i>	<b>0,025 %</b> tejido muscular de vaca	Pascoal y col. (2005)
V, O, CBR y CV	<i>12S</i> , <i>16S ARNr</i> y <i>ARNt<sup>val</sup></i>	<b>0,05 %</b> HCH de las especies diana	Ha y col. (2006)
V, O, C y P	<i>ATPasa8</i> , <i>16S ARNr</i> y <i>cytB</i>	<b>0,2 %</b> HCH de las especies diana	Frezza y col. (2008)
C	<i>ATPasa6</i>	<b>0,001 %</b> HCH de cerdo	Yoshida y col. (2009)
A	<i>12S ARNr</i>	<b>0,1-3 %</b> ADN diana	Farajollahi y col. (2009)
CV	<i>16S ARNr</i>	<b>0,1 pg</b> ADN diana	Shinoda y col. (2010)
V, O, CBR, PD	<i>ATPasa8</i> , <i>12S ARNr</i> y <i>cytB</i>	<b>0,01 %</b> HCH de las especies diana	Safdar y Junejo (2015a)

HCH, Harinas de carne y huesos; V, Vaca; O, Oveja; C, Cerdo; P, Pollo; R, Rumiantes; S, Suidos; A, Aves; CB, Caballo; PD, Pescado; CBR, Cabra; CV, Cérvidos; M, Mamíferos.

Fuente: Elaboración propia

#### II.2.2.4.2. PCR en tiempo real

Actualmente, los ensayos de PCR clásicos que se desarrollan en varios pasos, desde la amplificación del material genético al análisis de los productos resultantes, están evolucionando hacia procedimientos más rápidos y automatizados en un solo tubo, entre los que destaca la técnica de PCR en tiempo real (Higuchi y col., 1993). Esta metodología se basa en la utilización de equipos con un sistema de detección espectrofluorimétrica, que permiten el análisis continuo de la amplificación del ADN y, por tanto, la identificación en tiempo real del producto de amplificación generado. A diferencia de la técnica de PCR convencional, en los sistemas de PCR en tiempo real, un programa informático va registrando el incremento de fluorescencia, que es proporcional al aumento de ADN en cada ciclo, y esta información se refleja gráficamente en rectas de cinética de la reacción o rectas de amplificación. Para cada muestra, el programa informático calcula el número de ciclo en el que el lector empieza a detectar un incremento de fluorescencia significativo con respecto a la señal base. El ciclo en el que empieza a detectar el aumento de fluorescencia se denomina ciclo umbral (*Ct*, *Cycle Threshold*) o punto de corte (*Cp*, *Crossing Point*), y es inversamente proporcional a la concentración inicial de ADN diana presente en la muestra. Así, cuanto mayor sea el número inicial de copias del ácido nucleico diana, antes se detectará un incremento en la fluorescencia como consecuencia del acúmulo de productos de PCR. Una de las principales ventajas de esta metodología es que proporciona un resultado numérico en tiempo real que permite la cuantificación de las especies de interés y el tratamiento estadístico de los datos obtenidos (Wilhelm y Pingoud, 2003). Además, el tiempo de análisis se reduce al no requerir procesado post-amplificación, y se minimizan las posibilidades de contaminación con ADN exógeno al realizarse todo el proceso en el mismo tubo (Brodmann y Moor, 2003; Zhang y col., 2007; Martín, 2011).

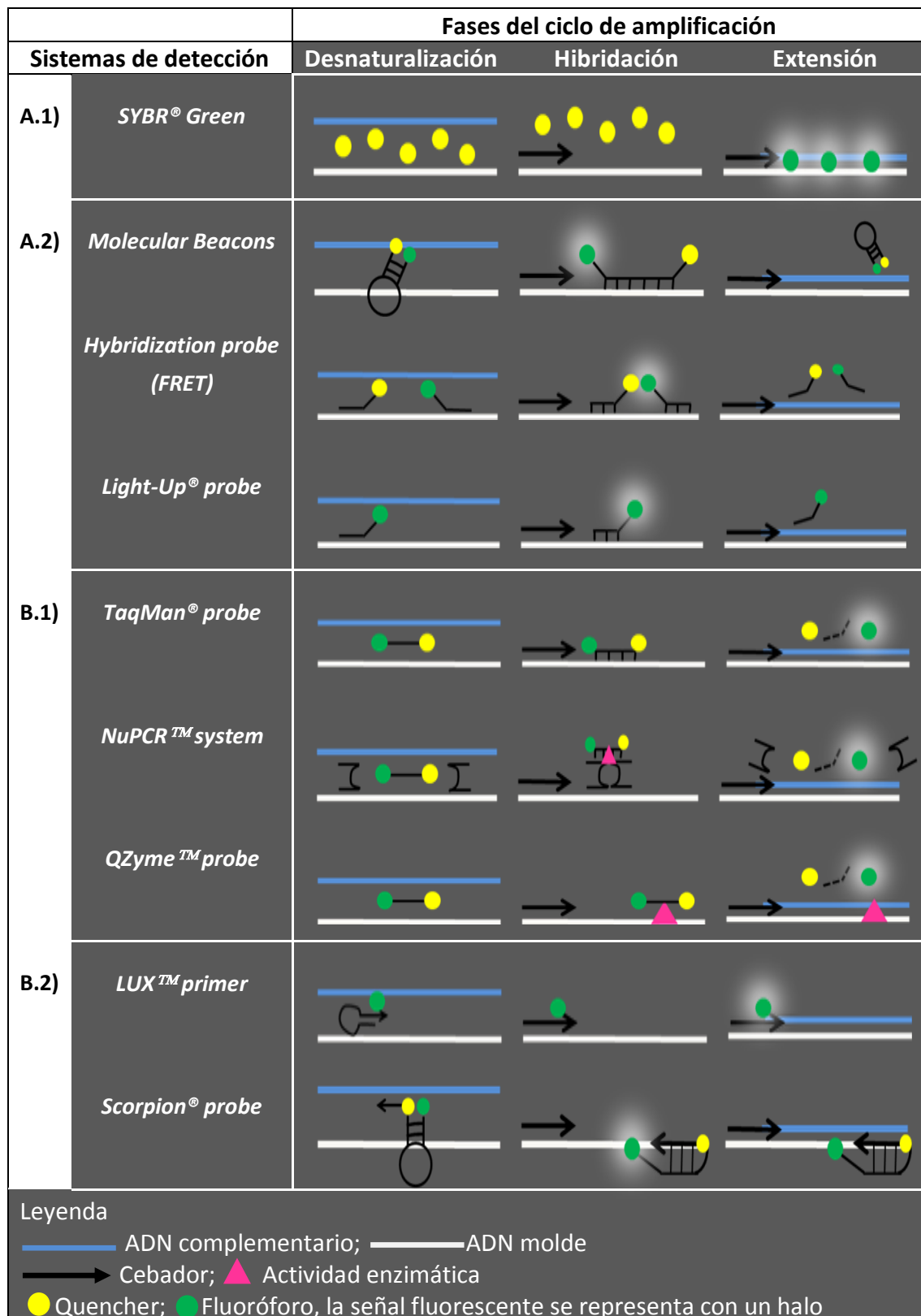
En los últimos años, se han descrito diversos sistemas para el seguimiento en tiempo real de la amplificación por PCR, que se pueden clasificar en dos grandes grupos: sistemas no específicos y sistemas específicos de secuencia del ADN diana. Los sistemas no específicos detectan la presencia o ausencia de amplicones, pero no proporcionan información sobre la identidad de los productos generados. Por su parte, los sistemas específicos hibridan específicamente en la secuencia del ADN diana. La Figura 7 muestra una clasificación más exhaustiva de los sistemas de detección de fluorescencia empleados en los ensayos de PCR en tiempo real. Estos se pueden agrupar en: A) sistemas no específicos que emplean intercaladores fluorescentes de la doble cadena de ADN (A.1), o del ADN monocatenario (A.2), liberados íntegros durante la fase de extensión; y B) sistemas específicos que emplean compuestos que emiten fluorescencia por la hidrólisis de la sonda (B.1), o por la creación de distancia física entre el fluoróforo y su aceptor (*quencher*), durante la fase de extensión (B.2) (Ruijter y col., 2014).

De acuerdo a la bibliografía disponible, las sondas de hidrólisis TaqMan<sup>®</sup> se encuentran entre las químicas de detección de fluorescencia más generalizadas en las técnicas de PCR en tiempo real (López-Andreo y col., 2005; Laube y col., 2007; López-



Calleja y col., 2007a, b; Jonker y col., 2008). A diferencia de otros agentes fluorescentes, las sondas TaqMan<sup>®</sup> (Holland y col., 1991) son oligonucleótidos marcados con fluorocromos en los dos extremos, que son capaces de hibridar en regiones internas y específicas de la secuencia del ADN diana, evitando falsos positivos si se generan productos de PCR inespecíficos o dímeros de cebadores. El fluorocromo situado en el extremo 5' se llama donador (*reporter*) y el del extremo 3' recibe el nombre de aceptor (*quencher*). Cuando la sonda (que se incluye en la reacción de PCR conjuntamente con los cebadores) está íntegra, la proximidad del donador y del aceptor provoca un fenómeno denominado FRET (transferencia de energía de resonancia de Förster o transferencia de energía de resonancia fluorescente), que se traduce en la anulación de la fluorescencia de la sonda. En el curso de la reacción de PCR, la sonda se une a su secuencia diana cuando se encuentra presente en la reacción. Durante la extensión de la cadena de ADN, la actividad 5' exonucleasa de la enzima *Taq* polimerasa provoca la liberación del donador del extremo 5' de la sonda, que al separarse del aceptor comienza a emitir fluorescencia. La acumulación de los productos de PCR se detecta monitorizando el aumento de fluorescencia por la liberación del donador (Gašparič y col., 2010; Ruijter y col., 2014). Los ensayos de PCR con sondas TaqMan<sup>®</sup> permiten combinar en una reacción sondas marcadas con diferentes fluoróforos para detectar distintos ADNs diana en la misma muestra. Esta variante de la amplificación en tiempo real se conoce como PCR múltiple, donde se emplean dos o más sistemas de cebadores-sonda en un único tubo con el fin de amplificar y detectar simultáneamente diferentes dianas (Ali y col., 2014).

En la actualidad, existen en el mercado distintos equipos de PCR en tiempo real, todos ellos compuestos por un termociclador que contiene un lector de fluorescencia. Los más utilizados son los fabricados por Applied Biosystems (Foster City, California, USA) y Roche Diagnostics (Mannheim, Alemania). Las principales diferencias entre ellos están relacionadas con la rapidez y el número de muestras que se pueden procesar a la vez. El número de canales de lectura que presentan los equipos también es importante a la hora de detectar la emisión de distintos fluorocromos simultáneamente. De esa forma, se pueden identificar diferentes tipos de ADN diana en la misma reacción (PCR múltiple), incorporando controles internos para detectar la presencia de inhibidores. Los equipos de PCR en tiempo real disponibles actualmente en el mercado presentan, como máximo, seis canales de lectura permitiendo una detección limitada de marcadores genéticos en un mismo ensayo.



**Figura 7.** Representación esquemática de los sistemas de detección de fluorescencia en los ensayos de PCR en tiempo real más utilizados.

Fuente: Gašparič y col. (2010); Ruijter y col. (2014)

En el ámbito de la industria alimentaria, las aplicaciones de la técnica de PCR en tiempo real se circunscriben a las siguientes áreas: a) detección y cuantificación de organismos modificados genéticamente (OMGs) (Dörries y col., 2010; Gašparič y col., 2010; Pansiot y col., 2011; Huber y col., 2013), b) detección y enumeración de microorganismos (Postollec y col., 2011) y c) autenticación de alimentos y piensos (Ballin, 2010; Bottero y Dalmaso, 2011; Ali y col., 2012, 2014).

La Tabla 8 incluye algunos de los principales trabajos sobre la aplicación de los ensayos de PCR en tiempo real para la detección y cuantificación de componentes de origen animal en piensos. La mayoría de estos trabajos detectan la presencia en piensos de harinas de especies rumiantes, y en menor medida, harinas de otros mamíferos, aves y especies de pescado.

Por ejemplo, Fumière y col. (2006) diseñaron dos parejas de cebadores y dos sondas TaqMan<sup>®</sup> en una región de 68 pb comprendida entre los genes mitocondriales ARNt<sup>Lys</sup> y la subunidad 8 de la ATPasa, para detectar harinas de carne y huesos de vaca y de cerdo en harinas de pescado y piensos compuestos. Para evaluar la influencia de los tratamientos térmicos en la aplicabilidad del ensayo, las harinas de carne y huesos de vaca y cerdo se sometieron a 125, 130, 135, 138 y 141 °C durante 20 minutos. Los resultados obtenidos mostraron la capacidad de la técnica para detectar la presencia de las especies diana incluso en las muestras tratadas a 141 °C. Este ensayo fue evaluado en dos estudios comparativos, uno de ellos llevado a cabo en 2004 por la Dirección General de Sanidad y Protección de los Consumidores de la UE (DG SANCO, Bélgica) (Gizzi y col., 2004) y el otro desarrollado por tres centros de investigación italianos en 2005: el *Centro di Referenza per le Encefalopatie Animali* (Turín, Italia), el *Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta* (Turín, Italia) y el *Centro di Referenza per la Sorveglianza e il Controllo degli Alimenti per gli Animali* (Brescia, Italia). En el estudio desarrollado por SANCO se analizaron veinticuatro muestras de pienso para vaca que contenían un 5 % de harinas de pescado o de aves, así como un 0,1 o 0,5 % de harinas de vaca y cerdo tratadas a 127 o 134 °C durante 20 minutos. La técnica consiguió detectar y diferenciar entre las harinas de vaca y cerdo, y las harinas de pescado y aves en un 95 % de las muestras analizadas. Los resultados del estudio comparativo realizado por los centros italianos fueron similares a los obtenidos por Gizzi y col. (2004), demostrando la conveniencia del empleo de la técnica de PCR en tiempo real para la detección de hasta un 0,1 % de harinas animales sometidas a las condiciones de procesamiento requeridas por la Unión Europea para procesar los subproductos animales.

Prado y col. (2007) llevaron a cabo un estudio interlaboratorial que evaluaba la capacidad de cuatro protocolos de PCR en tiempo real para detectar e identificar la presencia de harinas de vaca y otros rumiantes en piensos. Los protocolos fueron desarrollados por tres laboratorios expertos de la Unión Europea: el *Walloon Agricultural Research Centre* (CRA-W, Bélgica), el *Netherlands Organisation for Applied Scientific Research* (TNO, Países Bajos) y la *Veterinary Laboratories Agency* (VLA, Inglaterra), los cuales analizaron quince muestras de piensos para vaca, cerdo y pollo

que contenían distintos porcentajes (0, 0,1 y 0,5 %) de harinas de carne y huesos de vaca tratadas a 133 °C y 3 bares de presión durante 20 minutos, así como un 5 % de harinas de plumas, pescado o carne y huesos de cerdo. Los resultados obtenidos demostraron la capacidad de los cuatro protocolos para detectar hasta un 0,1 % de harinas de carne y huesos de vaca, incluso en las muestras que contenían un 5 % de harinas de pescado y plumas. Sin embargo, se obtuvieron algunos falsos positivos, concretamente en las muestras de piensos para cerdo que no contenían harinas de carne y huesos (controles negativos), analizados con los sistemas desarrollados por los laboratorios CRA-W y TNO. La presencia de cantidades residuales de grasa animal en los piensos para cerdo podría explicar estos resultados. Por ello, en este estudio también se evaluó la capacidad de los ensayos para detectar grasa de vaca en piensos. Los sistemas desarrollados por los laboratorios CRA-W y TNO permitieron detectar hasta un 4 % de grasa de vaca en las muestras analizadas, mientras que con el sistema de PCR diseñado por el VLA se obtuvieron resultados negativos.

Prado y col. (2009) evaluaron la posibilidad de realizar la transferencia del ensayo de PCR en tiempo real desarrollado por el laboratorio *Walloon Agricultural Research Centre* (CRA-W, Bélgica) a otro laboratorio experto de la Unión Europea, el *Institute for Reference Materials and Measurements* (IRMM, Bélgica) para detectar la presencia de harinas de vaca en piensos. Así, ambos laboratorios aplicaron la técnica al análisis de muestras de piensos para rumiantes que contenían 0, 0,05, 0,1 y 0,25 % de harinas de carne y huesos de vaca sometidas a un tratamiento de 134 °C durante 20 minutos. Los resultados obtenidos mostraron que, si bien los diferentes métodos de extracción de ADN utilizados por los laboratorios influían en la sensibilidad de la técnica, fue posible la detección de hasta un 0,1 % de harinas animales en los piensos analizados. Estos resultados reflejarían la conveniencia de la técnica de PCR en tiempo real para el control rutinario de los piensos, independientemente del laboratorio donde se realice el análisis.

Myers y col. (2010) estudiaron la influencia de los distintos métodos de extracción de ADN sobre la capacidad de una técnica de PCR en tiempo real para detectar harinas animales en piensos. Estos investigadores evaluaron ocho kits comerciales: *DNA forensic* (Invitek, Berlín, Alemania), *ChargeSwitch® gDNA Rendered Meat Purification* (Invitrogen Corp., Carlsbad, California, USA), *Nucleon™ HT for Hard Tissue* (Amersham BioScience, Piscataway, New Jersey, USA), *Promega Wizard® MiniPrep* (Promega Corp., Madison, Wisconsin, USA), *Roche High Pure PCR Template Preparation* (Roche Applied Science, Indianapolis, Indiana, USA), *QIAamp® DNA Mini*, *DNeasy Tissue* y *QIAamp® DNA Stool Mini* (Qiagen, Valencia, California, USA). Para ello, extrajeron el ADN a partir de: a) harinas de carne y huesos de vaca y cerdo tratadas de 125 a 131 °C durante 30 min, o a 133 °C durante 20 min, b) harinas de oveja y c) piensos para vacas lecheras que contenían 0,1 % de harinas bovinas. A pesar de que los resultados obtenidos fueron satisfactorios, los valores registrados tras las amplificaciones mostraron que la clase de muestra analizada, así como el tipo de kit empleado, influían en la calidad y cantidad del ADN extraído.

Benedetto y col. (2011) llevaron a cabo una técnica de PCR en tiempo real para la detección y cuantificación de harinas de pescado en piensos, utilizando sondas TaqMan<sup>®</sup> MGB (*Minor Groove Binder*) y una pareja de cebadores que amplificaba fragmentos de pequeño tamaño (121-124 pb) en el gen mitocondrial 12S ARNr de pescados. El análisis de mezclas binarias que contenían distintos porcentajes (0,08-10 %) de harinas de pescado indicó la capacidad del ensayo para detectar hasta el porcentaje más bajo, y hasta 0,2 pg de ADN diana. No obstante, los resultados también pusieron de manifiesto que la aplicación de esta técnica para la cuantificación de especies en piensos se encuentra limitada debido a la variabilidad asociada al número de mitocondrias existentes en cada tejido a analizar.

Prado y col. (2012) desarrollaron una técnica de PCR en tiempo real en el gen nuclear de la rodopsina, para detectar y cuantificar harinas de pescado en piensos. A pesar de que el empleo de genes nucleares de copia única supera el inconveniente del diferente número de copias de los marcadores mitocondriales en función del tejido, la variabilidad observada en los resultados no permitió una cuantificación precisa de las harinas de pescado. No obstante, el método de PCR desarrollado permitió la detección de ADN procedente de las veintidos especies de pescados incluidas en los análisis. En otro trabajo, Prado y col. (2013) diseñaron una pareja de cebadores y una sonda TaqMan<sup>®</sup> en el gen nuclear que codifica la parvalbúmina, para detectar dos especies de pescados, caballa y jurel, de uso común en harinas de pescado destinadas a la alimentación animal. Los resultados obtenidos demostraron la capacidad del método para detectar y diferenciar el ADN de ambas especies.

Von Holst y col. (2012) evaluaron la influencia del tratamiento térmico en la capacidad de una técnica de PCR en tiempo real para detectar y cuantificar harinas animales en piensos. Para ello analizaron harinas de carne y huesos de dos especies (vaca y cerdo) esterilizadas a 130, 135, 138, y 141 °C. El análisis de las muestras demostró que, a medida que aumentaba la intensidad del tratamiento térmico se observaba una disminución en el número de copias de ADN detectadas, siendo ésta más acusada en el rango de temperaturas de 135 a 138 °C.

Ekins y col. (2012) diseñaron un ensayo de PCR dúplex en tiempo real con sondas TaqMan<sup>®</sup> para la detección de harinas de carne y huesos de vaca, oveja y cabra tratadas a diferentes temperaturas, empleando una pareja de cebadores específicos de rumiantes en el gen citocromo oxidasa I y otra pareja como control endógeno. El método desarrollado permitió la detección de hasta un 0,1 % de harinas de vaca, oveja y cabra en todas las muestras analizadas en menos de una hora y media.

Debido a la demostrada utilidad de la técnica de PCR en tiempo real para el control de la autenticidad de piensos, en el transcurso del año 2012, el EURL-AP (Bélgica) validó un nuevo método de detección de componentes de origen rumiante basado en esta metodología y desarrollado por la *Netherlands Organisation for Applied Scientific Research* (TNO, Países Bajos) (Fumière y col., 2012a). Un estudio posterior, organizado por el EURL-AP y desarrollado conjuntamente con los laboratorios

nacionales de referencia de los Estados miembros, demostró la aplicabilidad de la metodología de PCR en tiempo real para el control rutinario de los piensos en la Unión (Fumière y col., 2012b). La técnica emplea una pareja de cebadores comunes al grupo de los rumiantes que delimitan un fragmento específico de un gen nuclear multicopia de estas especies, y una sonda TaqMan<sup>®</sup> interna a la región delimitada por la pareja de cebadores específicos. Estos estudios concluyen que la utilización de este nuevo método de PCR en tiempo real, sólo o en combinación con el examen microscópico, según proceda, constituye una herramienta útil de detección de material rumiante para garantizar el cumplimiento de las normas de la UE, facilitar la trazabilidad de los productos comercializados y evitar prácticas fraudulentas en la elaboración de piensos. Por lo tanto, y como ya se ha señalado previamente, de conformidad con las disposiciones establecidas en el nuevo Reglamento UE 51/2013 (DOUE de 23 de enero de 2013), la determinación de los componentes de origen animal con fines de control oficial de los piensos se realizará por microscopía óptica y/o por la técnica de PCR en tiempo real. El método oficial de PCR, desarrollado por la TNO (Países Bajos) y validado por el EURL-AP (Bélgica) (Fumière y col., 2012a), constituye un importante avance en la identificación de proteínas animales en piensos, y una herramienta muy útil para reforzar la trazabilidad y autenticidad de los productos. Según las disposiciones del Reglamento UE 51/2013, para llevar a cabo el análisis por PCR de un pienso se submuestrearán 50 g de la muestra cuidadosamente molida, de los que se prepararán dos porciones para análisis de al menos 100 mg cada una. La extracción del ADN amplificable se realizará en cada porción para análisis, en paralelo con dos controles de extracción (blanco y positivo), empleando el kit comercial *Wizard<sup>®</sup> Magnetic DNA Purification System for Food* (Promega, Madison, WI, USA) de conformidad con los PNT establecidos por el EURL-AP y publicados en su sitio web (<http://eurl.craw.eu/>). A continuación, la amplificación genética se llevará a cabo utilizando: (1) soluciones de mezclas de reacción que no contengan reactivos que pudieran falsear los resultados debido a la presencia de ADN de origen animal, y (2) cebadores y sondas con secuencias de oligonucleótidos validadas por el EURL-AP que, al igual que los procedimientos de extracción de ADN, están detalladas en los PNT y publicados en su sitio web. Finalmente, la expresión de los resultados se notificará como presencia o ausencia de ADN de la especie animal o grupo de especies animales diana, y se basará en la integración de los resultados de las dos porciones para análisis. Hasta la fecha, las secuencias disponibles en la web (<http://eurl.craw.eu/>) consisten en una pareja de cebadores específicos y comunes al grupo de los rumiantes diseñados en un gen nuclear multicopia de estas especies, y una sonda interna a la región delimitada por la pareja de cebadores específicos. En un estudio comparativo organizado en 2013 por el EURL-AP, y en el que participaban veintisiete laboratorios nacionales de referencia, se evaluó la aplicabilidad del nuevo método oficial de PCR en tiempo real para la detección de proteína de origen rumiante en piensos. La técnica se aplicó al análisis de cinco muestras ciegas, dos de las cuales eran piensos sin adulterar destinados a la alimentación de pescados, otras dos contenían 0,1 % de proteína animal procesada de vaca tratada a

137 °C, y la muestra restante era un pienso que contenía de manera aleatoria proteína animal procesada de vaca, oveja o cerdo. Los resultados obtenidos mostraron una excelente reproducibilidad, en términos de sensibilidad y especificidad, que indican la adecuada implementación del método oficial de PCR en tiempo real por parte de los laboratorios participantes (Fumière y col., 2013). Un estudio posterior, publicado por Fumière y col. (2014) y desarrollado por veintisiete laboratorios nacionales de referencia, evaluó el método oficial de PCR en tiempo real para la detección de proteína rumiante en piensos de acuicultura. La técnica se aplicó al análisis de seis muestras ciegas, cinco de las cuales contenían hasta 0,1 % de proteína animal procesada de vaca tratada a 137 °C, y la muestra restante contenía 0,1 % de proteína de oveja tratada a 133 °C. Los resultados obtenidos por la mayoría de los laboratorios participantes (19 de los 27) concordaron con la composición de las muestras.

**Tabla 8.** Principales trabajos sobre la aplicación de la técnica de PCR en tiempo real para la detección e identificación de componentes de origen animal en piensos.

Especies	Marcador genético	Límite de detección	Referencia
<b>Rumiantes</b>			
V	<i>ATPasa6 y 8</i>	<b>0,001 %</b> ADN de vaca	Lahiff y col. (2002)
V	<i>hormona del crecimiento</i>	<b>1 %</b> HCH de vaca	Brodmann y Moor (2003)
R	SINE Bov-A2	<b>10 fg</b> ADN de vaca	Mendoza-Romero y col. (2004)
R	<i>16S ARNr</i>		Chiappini y col. (2005)
R	<i>cytB</i>	<b>0,001 %</b> HCH de vaca y <b>0,1 %</b> de oveja	Rensen y col. (2005, 2006)
R	SINE Bov-B	<b>0,1 %</b> HCH de vaca y oveja	Aarts y col. (2006)
V y R	ADN mitocondrial y elementos repetitivos	<b>0,1 %</b> HCH de vaca	Prado y col. (2007)
V	<i>12S ARNr</i>	<b>0,1 %</b> HCH de vaca	Martín y col. (2008)
CV	<i>cytB</i>	<b>0,1 %</b> harina de carne de ciervo	Chen y col. (2009)
R	<i>COI</i>	<b>0,1 %</b> HCH de vaca, oveja y cabra	Ekins y col. (2012)
V y CBR	<i>16S ARNr</i> y <i>12S ARNr</i>	<b>0,003 %</b> HCH de vaca y <b>0,005 %</b> de oveja	Safdar y col. (2014)
<b>Otros mamíferos, aves y pescados</b>			
V, O, C y P	<i>ARNt<sup>lys</sup></i> , <i>ATPasa6 y 8</i>	<b>0,01 %</b> HCH de las especies diana	Krcmár y Rencová (2005)
R, C y P	gen <i>PRNP</i>	<b>0,1 %</b> HCH de rumiantes	Bellagamba y col. (2006)
V y C	<i>ARNt<sup>lys</sup></i> y <i>ATPasa8</i>	<b>0,1 %</b> HCH de vaca y cerdo	Fumière y col. (2006)
V, O, C y P	<i>ATPasa8</i> , <i>16S ARNr</i> y <i>cytB</i>	<b>0,5 %</b> HCH de las especies diana	Frezza y col. (2008)
V, O, C y P	<i>16S ARNr</i>	<b>0,1 %</b> HCH de las especies diana	Cawthraw y col. (2009)
V, O, CBR y A	<i>ATPasa8</i> , <i>16S ARNr</i> y <i>cytB</i>	<b>0,1 %</b> HCH de vaca y oveja	Yancy y col. (2009)
C	<i>12S ARNr</i>	<b>0,1 %</b> HCH de cerdo	Martín y col. (2009c)
PD	<i>12S ARNr</i>	<b>0,078 %</b> harinas de pescado	Benedetto y col. (2011)
PD	<i>12S ARNr</i>	<b>0,1 %</b> harinas de pescado	Martín y col. (2010)
PD	genes <i>RHO</i> y <i>PVALB</i>	<b>≤ 0,05 ng</b> ADN de pescado	Prado y col. (2012, 2013)
V y P	<i>12S ARNr</i> y <i>cytB</i>	<b>0,001 %</b> HCH de las especies diana	Safdar y Junejo (2015b)

HCH, Harinas de carne y huesos; V, Vaca; O, Oveja; CBR, Cabra; C, Cerdo; P, Pollo; R, Rumiantes; A, Aves; PD, Pescado; CV, Cérvidos.

Fuente: Elaboración propia



#### II.2.2.4.3. Microarrays de ADN

Un microarray o chip de ADN consiste en una red muy precisa de alta densidad compuesta de moléculas de ácidos nucleicos de una sola cadena, denominados sondas, unidas covalentemente a la superficie de un pequeño soporte sólido. La utilidad de este formato deriva de la propiedad que tienen las sondas para hibridar, con una elevada especificidad, a una secuencia complementaria. Por ello los microarrays de ADN se pueden emplear para “interrogar” mezclas complejas de miles de ácidos nucleicos, permitiendo localizar una secuencia homóloga denominada diana en una muestra problema (Justé y col., 2008).

Chisholm y col. (2008) utilizaron el sistema *FoodExpert ID*<sup>®</sup> desarrollado por bioMerieux (Marcy-l'Etoile, Francia), para detectar e identificar hasta 32 especies animales (mamíferos, aves y pescado) en alimentos y piensos. *FoodExpert ID*<sup>®</sup> está constituido por un chip de ADN que contiene aproximadamente unas 80 000 sondas complementarias a secuencias específicas del gen citocromo b de vertebrados. Para utilizar este sistema, el ADN de las muestras se amplifica y posteriormente se transcribe en ARN, se marca con compuestos fluorescentes y se hibrida con el chip. Las secuencias complementarias a las sondas del chip se unen a este, y son detectadas mediante un lector de fluorescencia. El empleo de este chip de ADN permitió detectar un 1 % de cerdo, oveja y vaca, así como un 0,1 % de pollo y pavo en los piensos analizados.

Teletchea y col. (2008) utilizaron la técnica de microarrays de ADN para identificar 71 especies animales en alimentos. Para ello, amplificaron tres fragmentos de 373, 268 y 124 pb del gen citocromo b. La hibridación de las secuencias diana con las sondas especie-específicas permitió la detección de las especies analizadas en muestras cárnicas. Además, demostraron la aplicabilidad de la técnica para el análisis de alimentos procesados y la compararon con otras técnicas como la PCR-secuenciación. La técnica de microarrays de ADN demostró ser más adecuada, ya que permitió detectar con mayor rapidez un gran número de especies en las muestras analizadas.

Iwobi y col. (2011) compararon y evaluaron dos kits comerciales para detectar hasta catorce especies animales en alimentos: el sistema *CarnoCheck*<sup>®</sup> (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Alemania) y *Meat Species 1.6 LCD Array Kit* (Chipron GmbH, Berlín, Alemania). El empleo de ambos chips de ADN permitió detectar entre 0,1 y 0,5 % de las especies diana en mezclas cárnicas. Asimismo, demostraron la aplicabilidad de los dos sistemas mediante el análisis de más de setenta muestras cárnicas comerciales.

A pesar de las ventajas que ofrecen los microarrays de ADN en términos de rapidez y sencillez, su utilización en el control rutinario para la identificación de especies animales en piensos se encuentra todavía limitada debido su elevado coste y a la laboriosidad del diseño del chip.

#### II.2.2.4.4. Técnicas de secuenciación masiva en paralelo. Pirosecuenciación

Desde los años 70 a la actualidad, hemos asistido a una revolución en el área de la biología molecular y, en concreto, en el campo de la secuenciación de ácidos nucleicos. El método enzimático de terminación de cadena descrito por Sanger y col. (1977) ha sido la técnica de secuenciación de ADN más utilizada en las últimas décadas. Esta técnica se basa en la extensión de la cadena simple de ADN mediante la incorporación de análogos de nucleótidos que sirven como terminadores de cadena, ya que carecen de terminaciones 3' hidroxilo. De este modo, se acumulan una serie de cadenas de distintas longitudes que se separan en un gel de electroforesis, donde los fragmentos aparecen como una escalera de bandas, y la secuencia puede determinarse leyendo el patrón de bandas obtenidas.

Posteriormente, el empleo de compuestos fluorescentes y otras modificaciones permitieron automatizar el proceso, consiguiendo enormes avances como la secuenciación del genoma humano completo (*International Human Genome Consortium*, 2004). No obstante, el método de secuenciación automática sigue siendo una herramienta analítica costosa para análisis rutinarios. En la búsqueda de soluciones más económicas y rápidas, los laboratorios y empresas biotecnológicas han desarrollado nuevas tecnologías capaces de generar cientos de miles de reacciones de secuencias en paralelo gracias a la inmovilización de dichas reacciones (nanorreacciones) en una superficie sólida. De esta forma, la cantidad de reactivos necesarios se minimiza y se abarata el coste por base leída. Mientras que la secuenciación automática se considera como una tecnología de "primera generación", a los métodos desarrollados posteriormente se les conoce como métodos de secuenciación masiva en paralelo (MPS, *Massive Parallel Sequencing*) o de "nueva generación" (NGS, *Next Generation Sequencing*) (Metzker, 2010). En la actualidad, existen en el mercado distintas tecnologías de secuenciación masiva de ADN, entre las que se incluyen: la pirosecuenciación (Ronaghi y col., 1996, 1998), la secuenciación por nanoporos (Deamer y Branton, 2002; Wanunu y Meller, 2008), la secuenciación por hibridación (SBH, *Sequencing By Hybridization*) (Bains y Smith, 1988; Drmanac y col., 1989; Khrapko y col., 1989), la secuenciación por terminadores reversibles (CRT, *Cyclic Reversible Termination*) (Canard y Sarfati, 1994; Metzker y col., 1994) o la secuenciación por ligación (SBL, *Sequencing By Ligation*) (Brenner y col., 2000).

Las técnicas de secuenciación masiva han revolucionado el campo de la genómica y, en particular, la investigación en epigenética (Wold y Myers, 2008; *Roadmap Epigenomics Consortium*, 2015). Entre ellas, la pirosecuenciación fue el primer método utilizado en una plataforma comercial de secuenciación masiva en paralelo (Margulies y col., 2005), y marcó el comienzo de la nueva era del análisis genómico. La técnica de pirosecuenciación se basa en la detección del pirofosfato liberado en la reacción de polimerización que, mediante una cascada de reacciones enzimáticas, genera luz visible proporcional al número de nucleótidos incorporados durante la elongación. La adición consecutiva de nucleótidos genera un Pirograma<sup>®</sup>. Éste representa la dispensación

secuencial de los nucleótidos y la intensidad lumínica asociada que permite su cuantificación (Ronaghi, 2001). Margulies y col. (2005) desarrollaron la primera plataforma comercial de secuenciación masiva en paralelo, que permitió secuenciar 25 millones de bases, con al menos 99 % de precisión, en 4 horas, alcanzando un rendimiento cien veces superior a la cantidad de bases secuenciadas en ese tiempo mediante un secuenciador automatizado de Sanger. En esta técnica, el ADN diana se fragmenta y mediante ligación se le añaden secuencias adaptadoras a los extremos. Los fragmentos de ADN a continuación se separan en una sola hebra que se inmoviliza sobre la superficie de unas esferas en condiciones tales que favorecen que en cada esfera haya una sola molécula de ADN. Posteriormente, se amplifican en una PCR emulsionada, y se obtienen esferas con millones de copias del ADN molde. La emulsión se rompe, se desnaturaliza el ADN, y las esferas se depositan en pocillos individuales de una placa de muy pequeño volumen (escala de picolitros), donde tienen lugar las reacciones de pirosecuenciación (Margulies y col., 2005). Si bien una de las limitaciones de la técnica hace referencia al largo de lectura (de sólo cien nucleótidos), los equipos de secuenciación más recientes ya proporcionan lecturas de más de ochocientos nucleótidos de longitud, comparables a las obtenidas por el método de Sanger. No obstante, su gran inconveniente es la dificultad para las lecturas de regiones homopoliméricas (Metzker, 2010).

Los métodos de secuenciación masiva en general, y la pirosecuenciación en particular, constituyen una herramienta con un futuro prometedor en diversas áreas científicas, incluida la trazabilidad y autenticidad de alimentos y piensos. Sin embargo, su empleo en este campo es aún incipiente. Por ejemplo, Binladen y col. (2007) demostraron la capacidad de la técnica de pirosecuenciación masiva en paralelo para la lectura simultánea de fragmentos del gen mitocondrial 16S ARNr, permitiendo la diferenciación de trece especies de mamíferos. Ortola-Vidal y col. (2007) analizaron un fragmento de 104 pb del gen *rbcL* del cloroplasto, que permitió identificar polimorfismos de un solo nucleótido (SNP, *Single Nucleotide Polymorphism*) en varias especies de frutas. Asimismo, De Battisti y col. (2014) han empleado la técnica de pirosecuenciación para la detección de fraudes alimentarios, concretamente en productos derivados de la pesca. En este trabajo, se llevó a cabo la diferenciación de veinticinco especies de pescado en muestras crudas y procesadas mediante la amplificación y secuenciaron tres fragmentos de ADN en los genes 16S ARNr, citocromo b y la subunidad 2 de la NADH deshidrogenasa.

Algunos autores han empleado la pirosecuenciación para generar secuencias de ADN de referencia que actúen como etiquetas de identificación molecular de las especies objeto de análisis, en una técnica conocida como *DNA barcoding* o "código de barras de ADN". Esta tecnología se basa en la amplificación por PCR y secuenciación de un fragmento de aproximadamente 650 pb del gen mitocondrial que codifica la subunidad 1 de la enzima citocromo c oxidasa (COI), con el fin de generar secuencias de ADN diagnósticas. Así, mediante el estudio y comparación de cada secuencia de ADN problema con muestras de referencia, es posible la categorización de las secuencias y la

consiguiente identificación del origen de las muestras analizadas. Este sistema aporta grandes ventajas en comparación con los estándares taxonómicos empleados por bases de datos como *Genbank/EMBL* (*European Molecular Biology Laboratory*), dado que una gran parte de las secuencias acumuladas en dicha plataforma no cuenta con ejemplares de referencia de las especies estudiadas. Además, otra característica innovadora de la iniciativa *DNA barcoding* es que se utiliza la información de una misma región genética en todos los taxones, y con condiciones de secuenciación universalmente aceptadas y estandarizadas. El número de nuevas especies identificadas mediante esta técnica está creciendo exponencialmente y se espera que durante los próximos años se complete la biblioteca de códigos de barras genéticos de todas las especies conocidas (Galimberti y col., 2013, 2015). Sin embargo, cabe resaltar que la mayoría de estos trabajos se centran en estudios de biodiversidad y ecología (Hajibabaei y col., 2011; Raye y col., 2011; Shokralla y col., 2011), siendo aún incipientes las investigaciones dirigidas a la identificación de especies animales en alimentos (Eaton y col., 2009; Dalton y Kotze, 2011). Además, es importante señalar que esta técnica no resultaría adecuada para el análisis de alimentos y piensos sometidos a tratamientos térmicos intensos, ya que la degradación del ADN impediría la amplificación por PCR de fragmentos de elevado tamaño, como es el caso del fragmento de 650 pb del gen citocromo oxidasa (COI).

En resumen, debido a las ventajas en cuanto a rapidez, automatización y rendimiento, así como al progresivo abaratamiento de las técnicas de secuenciación masiva de ADN, en los próximos años se prevé su aplicación de forma rutinaria en diversos campos científicos. Concretamente, el empleo combinado de estas nuevas tecnologías y los métodos genéticos tradicionalmente empleados en el análisis de alimentos y piensos, constituye una herramienta con un futuro prometedor (ver capítulo VI. Trabajo Futuro).



### ***III. Results and Discussion***

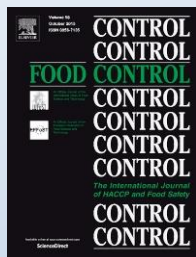




### III.1. DETECTION OF ANIMAL INGREDIENTS IN FEEDS BY REAL TIME PCR TECHNIQUES (Published articles)

#### III.1.1. RUMINANTS

**Applicability assessment of a real-time PCR assay for the specific detection of bovine, ovine and caprine material in feedstuffs.**



**Food Control**

***Volume 22, pages 1189-1196, 2011***

**Detection of banned ruminant-derived material in industrial feedstuffs by TaqMan real-time PCR assay.**



**Journal of Food Protection**

***Volume 74, pages 1300-1308, 2011***







Contents lists available at ScienceDirect

Food Control

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/foodcont](http://www.elsevier.com/locate/foodcont)

## Applicability assessment of a real-time PCR assay for the specific detection of bovine, ovine and caprine material in feedstuffs

Nicolette Pegels, Isabel González\*, Irene Martín, María Rojas, Teresa García, Rosario Martín

Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 17 September 2010

Received in revised form

20 December 2010

Accepted 20 January 2011

#### Keywords:

D-loop gene

TaqMan real-time PCR

Bovine

Ovine and caprine PAP

Industrial feeds

### ABSTRACT

A TaqMan real-time polymerase chain reaction (PCR) method was developed for specific detection of bovine, ovine and caprine processed animal protein (PAP) in industrial feedstuffs. The method uses species-specific primers and probes targeting short mitochondrial D-loop sequences, and a positive amplification control based on 18S rRNA gene. The applicability of the real-time PCR protocol was assessed through analysis of 126 industrial feed samples that were manufactured to reproduce rendering processes of commercial feeds destined for farmed animals. The assay successfully classified samples as positive or negative according to the ruminant composition, enabling qualitative detection of banned material in feeds at levels as low as 0.1%. Although the method provides quantitative potential, results suggest that the real quantitative capability of the assay is limited by the existing variability in terms of composition and processing treatments of the feeds, which affect the amount and quality of amplifiable DNA.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

The permanent ban within the European Union on the use of processed animal proteins (PAPs), including meat and bone meals (MBM), as ingredients in feed for all farm animals (European Commission, 2006) seems to be the most effective preventive measure to avoid the dissemination of bovine spongiform encephalopathy (BSE) and other transmissible spongiform encephalopathies (TSEs); and to minimize any potential risk of transmission to humans. During the last few years, the European Commission has been looking carefully into a partial amendment of the total feed ban, without affecting consumer's confidence or the policy of eradicating prion diseases. In this regard, a lifting of the prohibition on the inclusion of non-ruminant proteins in feedstuffs would be considered by European authorities if suitable methods for differentiating animal proteins of certain species were available (European Commission, 2005). Consequently, the development and validation of sensitive methods for the detection of MBM in feed at various taxonomic levels is a crucial factor in this field (Frezza et al., 2003; Prado et al., 2007).

The microscopic examination, based on the detection of animal bone fragments, has been recognized as the only official method in the European strategy against BSE and other TSEs (European

Commission, 2009). This method can detect animal proteins in the form of MBM at sufficiently low levels (0.1%). However, microscopic technique carries drawbacks (De la Roza-Delgado et al., 2007): it is time-consuming, it requires specialized staff and it does not catalogue the species of origin of the MBM. In this line, the current European regulation (EC N° 152/2009) suggests the use of alternative methods to improve detection and gain more information about the origin of the PAPs.

As a result of the growing attention on determining the species origin of animal tissues, a range of analytical approaches have been arisen for species identification in a wide array of degraded and processed substrates. These approaches are mainly based on DNA or protein detection (Van Raamsdonk et al., 2007). Methods based on protein detection applied to feedstuffs analysis are limited, mostly because the protein is denatured during feed processing procedures. Otherwise, the use of DNA as an analyte has two basic advantages: DNA is relatively stable at high temperature and therefore can withstand the feed rendering process; and because of its sequence variability, DNA can be used to identify the species of origin in a defined matrix (Dalmasso et al., 2004; Krcmár & Rencová, 2001). In particular, the amplification of specific DNA sequences by PCR provides a powerful and specific tool for detection of animal tissues in food and feed. However, it is critical to note that fragmentation of nucleic acids due to the high temperatures applied during feed processing, makes essential to develop PCR assays that rely on amplification of very short DNA targets (Colgan et al., 2001; Frezza et al., 2003; Martín et al., 2009).

\* Corresponding author. Tel.: +34 913943751; fax: +34 913943743.

E-mail address: [gonzalzi@vet.ucm.es](mailto:gonzalzi@vet.ucm.es) (I. González).

Most real-time PCR assays designed for detection of banned PAPs in feedstuffs test only for bovine material and will not detect tissues from other ruminant species (Frezza et al., 2003; Krcmár & Rencová, 2001; Martín et al., 2008; Tartaglia et al., 1998; Toyoda, Nakajo, Kawachi, Matsui, & Yano, 2004). The present work is aimed to the development of a TaqMan real-time PCR assay for the detection of bovine (*Bos taurus*), ovine (*Ovis aries*) and caprine (*Capra hircus*) MBM in feeds, based on species-specific short mitochondrial sequences. The applicability of the method was evaluated through analysis of 126 industrial feeds. The samples analyzed in this study were representative of compound feeds commercially available, which adds practical value to the work.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Sample selection

Feed samples used in this study (referred to as “industrial feeds”) were provided by the Centre Wallon de Recherches Agronomiques “CRA-W” (Gembloux, Belgium) and the Co-operative Central Laboratory “CCL-Nutricontrol” (Veghel, The Netherlands) (Table 3). Feeds consisted of different processed animal proteins (ruminant and non-ruminant PAPs), either alone or in a mixed feed matrix, and were manufactured following European legislation procedures to reproduce the rendering processes applied to commercial feedstuffs destined for farmed animals.

Industrial feeds to be analyzed were 13 reference samples containing bovine, ovine and caprine material, and a batch of 113 blind samples containing different concentrations of ruminant and non-ruminant PAPs. It should be noted that, in the case of caprine control references, experimentally prepared binary mixtures of caprine tissue in a plant matrix (oat) were used since feed material from this species was unavailable.

A wide range of non-target animal and plant species from different origins (Table 2) was also included for specificity control purposes. Muscle and other animal tissues were obtained from different origins: beef, sheep, goat, horse, pork, rabbit, turkey and chicken were provided by local slaughterhouses and retail shops; duck, goose and game bird species were provided by Antonio de Miguel (Madrid, Spain); cat, dog and rat were obtained from the Veterinary Hospital (Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, Spain); red deer, fallow deer, roe deer, chamois, Pyrenean ibex and mouflon were obtained from several Spanish meat-cutting installations. Besides, several fish and plant species samples were purchased from different local markets.

All animal specimens were morphologically identified by trained veterinarians. They were transported to the laboratory under refrigeration and were processed immediately or frozen at  $-85^{\circ}\text{C}$  until used.

### 2.2. DNA extraction

Two hundred milligrams of each feed were homogenized with 860  $\mu\text{L}$  of extraction buffer, pH 8.0 (10 mM Tris, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA and 1% SDS), 100  $\mu\text{L}$  of 5 M guanidine hydrochloride and 40  $\mu\text{L}$  of 20 mg/mL proteinase K (Merck, Darmstadt Germany), and incubated overnight at  $55^{\circ}\text{C}$  with shaking at 60 rpm. Then, the samples were left to cool at room temperature. Five hundred  $\mu\text{L}$  of chloroform (Sigma–Aldrich) were added to the lysate before centrifugation at  $16,438 \times g$  for 10 min.

Genomic DNA from the clear aqueous supernatant obtained after the centrifugation (500  $\mu\text{L}$ ) was purified using the Wizard® DNA Clean-up System kit (Promega, Madison, WI, USA) with a vacuum manifold, according to the manufacturer's instructions. The DNA was eluted in 100  $\mu\text{L}$  of sterile deionized water. DNA

concentration was measured with a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies Inc., Montchanin, DE). Unless otherwise stated, three DNA replicates were extracted from each feed sample. A negative control sample was included in every DNA extraction.

### 2.3. Oligonucleotide primers and probes

The oligonucleotides used in the real-time PCR assay were designed on the basis of mitochondrial D-loop and nuclear 18S rRNA gene sequences from various animal and plant species available in the NCBI (National Center for Biotechnology Information) database.

Alignment and computer analysis of mitochondrial D-loop sequences allowed the design of bovine (BDLOOPDIR/BDLOOPINV), ovine (ODLOOPDIR/ODLOOPINV) and caprine (CDLOOPDIR/CDLOOPINV) specific primer pairs for the amplification of DNA fragments of 76 bp, 77 bp and 91 bp, respectively.

TaqMan probes (BDLOOPP, ODLOOPP and CDLOOPP) were designed to anneal within the gene fragment generated by amplification of the corresponding ruminant target and were labeled on the 5' end with the fluorescent reporter dye 6-carboxyfluorescein (FAM) and on the 3' end with the blackberry (BBQ) fluorescent quencher. TaqMan probes were designed and synthesized by Tib-MolBiol (Berlin, Germany).

As a positive amplification control of real-time PCR experiments, universal primers (18SDIR/18SINV) and probe (18SP) were designed on a conserved 18S rRNA gene fragment in all eukaryotic cells. This set of primers was expected to produce amplicons of the same length (approximately 77 bp) in all species analyzed in this work.

The EMMA program included in the EMBOS software package version 2.0 and the Primer Express 2.0 software (Perkin–Elmer/Applied Biosystems Division, Foster City, CA) were used for sequence alignment and primer design. The sequences and description of every primer and probe used in this study are listed in Table 1.

### 2.4. Real-time PCR

Real-time PCR was run under generic cycling conditions. The optimum PCR concentrations of primers yielding the highest endpoint fluorescence and the lowest  $C_p$  were experimentally determined for each set of primers: 300 nM for forward primers and 900 nM for reverse primers. The PCR reactions were carried out using the LightCycler® TaqMan® Master (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany), 2 pmol of each TaqMan probe (TibMolBiol), and 100 ng of DNA. Amplification reactions were performed in a total reaction volume of 10  $\mu\text{L}$  in a glass capillary tube and were run on the LightCycler® 2.0 Instrument (Roche Applied Science, Penzberg, Germany) with the following program: 10 min at  $95^{\circ}\text{C}$  (denaturation and Taq polymerase activation), an amplification program of 45 cycles at  $95^{\circ}\text{C}$  for 10 s,  $58^{\circ}\text{C}$  for 30 s, and  $72^{\circ}\text{C}$  for 1 s. Samples were then cooled to  $40^{\circ}\text{C}$  for 30 s. The same program was used to amplify each of the species-specific PCR systems, along with the positive amplification control. Unless otherwise indicated, all real-time PCR reactions were carried out in triplicate for each DNA extract.

The crossing point value ( $C_p$ ), which refers to the cycle number where the sample's fluorescence significantly increases above the background level, was calculated automatically by the LightCycler® software as the first maximum of the second derivative of the curve. The continual measurement of fluorescence is related to the amount of amplicon in real-time PCR, yielding a qualitative result on the presence of the target species.

**Table 1**  
DNA sequences and description of the primers and probes used in this study.

Primers	Length (bp)	Sequence (5' → 3')	Description	Target gene	Fragment length (bp)
BDLOOPDIR	25	AACCAATATTACAAACCACTAGCT	Bovine-specific forward primer	D-loop	76
BDLOOPINV	21	CCTTGCGTAGGTAATTCATTCTG	Bovine-specific reverse primer		
ODLOOPDIR	23	ACTCCACAAGCCACATAACA	Ovine-specific forward primer	D-loop	77
ODLOOPINV	25	GGGTTTATGAACGCTCATGTCC	Ovine-specific reverse primer		
CDLOOPDIR	26	CCCAATCTAACCCTAGATAC	Caprine-specific forward primer	D-loop	91
CDLOOPINV	20	TGTGTAGCGAGCGGTGTA	Caprine-specific reverse primer		
18SDIR	16	TGGTGCCAGCAGCCG	Positive control forward primer	18S rRNA	77
18SINV	25	TCCAATACGAGCTTTTAAGTCA	Positive control reverse primer		
<b>Probes</b>					
BDLOOPP	26	6FAM-ACATAACAGCCCATACAGACCAC-BBQ	Bovine probe	D-loop	
ODLOOPP	30	6FAM-CATACAAGAAAGCACAACCCACCCAC-BBQ	Ovine probe	D-loop	
CDLOOPP	30	6FAM-TGCATACACGTAATATTGTGGTGTGGC-BBQ	Caprine probe	D-loop	
18SP	22	6FAM-CGCTATTGGA+G+CT+G+GAATTACC-BBQ	Universal probe	18S rRNA	

+ Symbol denotes the LNA (Locked Nucleotide Acids) bases.

### 2.5. Construction of standard curves and data analysis

To check the ability of the real-time PCR method for quantitative detection, standard curves were constructed using two arrays of matrix-matched bovine (B2–B5) and ovine (O1–O6) reference samples rendered under homogeneous conditions and containing increasing known amounts of target material in their composition. The amount of target DNA in an unknown sample can be then measured by extrapolation of the  $C_p$  value obtained in the unknown sample in the corresponding standard curve of  $C_p$  values generated from known DNA percentages of the target species. In addition, the correlation between the variables, crossing point ( $C_p$ ) and concentration ( $[ ]$ ) is semilogarithmic:

$$C_p = b \log[ ] + a$$

where  $b$  is the slope and  $a$  is the intercept.

Linearity test, sensitivity, accuracy and precision parameters of the species-specific real-time PCR systems were evaluated according to previously described methods (Camacho, Torres, Gil-Alegre, Obregón, & Ruz, 1993; International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use [ICH], 2005). To carry out the validation of the real-time PCR technique developed in this work, three separate DNA extractions of each bovine and ovine percentage were assayed in different days, using three replicates of each sample. Precision of the assay was evaluated by comparing the coefficient of variation (CV) values obtained in three different days versus those obtained in the same day, to assess the influence of random events (day of analysis, analyst, equipment, etc.) in the data obtained from the feed samples.

## 3. Results and discussion

### 3.1. TaqMan real-time PCR

The real-time PCR assay developed in this work is based on species-specific primer pairs and TaqMan probes designed on mitochondrial D-loop sequences. Mitochondrial (mt) DNA evolves faster than nuclear DNA, providing the degree of sequence variation required for identification of closely related species. In particular, the D-loop region is interesting because it has the highest substitution rate of all mitochondrial sequences (Sbisà, Tanzariello, Reyes, Pesole, & Saccone, 1997). Besides, mitochondrial genes are present in multi copy in the cells increasing the sensitivity of the PCR and contributing to the recovery of at least a few copies when the tissue is subjected to

extreme processing conditions (Girish et al., 2004). Since a crucial point in PCR-based feed analysis is the heat degradation of DNA subsequent to the autoclaving specified by the European Community for thermal processing of animal ingredients, the selection of short length DNA target sequences is mandatory for successful system development (Cawthraw et al., 2009; Fumière, Dubois, Baeten, von Holst, & Berben, 2006; Hird et al., 2006; Prado et al., 2009; Van Raamsdonk et al., 2007). In the present work, short D-loop amplicons (76–91 bp) were chosen for real-time PCR analysis aimed to detection of bovine, ovine and caprine MBM in industrial feedstuffs.

### 3.2. Specificity and sensitivity

Specificity and sensitivity are two important indices of performance of qualitative assays. The close phylogenetic relationships among ruminant species, together with the varied number of animals and plants that can be present in compound feeds indicates the need to check the cross reactivity of the PCR against a wide range of species. Specificity of the bovine, ovine and caprine real-time PCR systems (primers and probes) was therefore assessed by analysis of the DNA extracted from fresh tissues of 31 animal species (mammals, fish and birds) and 14 plant species. As expected, the bovine (BDLOOP), ovine (ODLOOP) and caprine (CDLOOP) PCR systems successfully detected, respectively, DNA fragments of 76, 77 and 91 bp from the target tissues, while no positive amplification signal was obtained on the non-target animal and plant species tested. The 18S rRNA eukaryotic system amplified a 77 bp fragment from all samples tested (Table 2).

A part from the demand for specificity, real-time PCR methods intended for species detection in feedstuffs should be aimed at reaching a good sensitivity level when highly degraded DNA is present as consequence of rendered treatments (Van Raamsdonk et al., 2007). To determine the applicability and detection level of the real-time PCR assay developed in this work, a batch of industrial feeds manufactured according to European guidelines were analyzed for the presence of banned ruminant (bovine, ovine and caprine) material. Thirteen known reference samples and one hundred and thirteen blind samples were assayed with each species-specific PCR system and the universal 18S rRNA amplification control. After the analyses were finished, the European laboratories provided us with the data on the actual composition and treatment of the blind feed samples.

Results obtained indicated that bovine and ovine D-loop species-specific real-time PCR systems allowed to classify correctly 100% of the blind samples containing different levels of target (42 of

**Table 2**  
Specificity of the real-time PCR systems ( $C_p$  values obtained from 100 ng DNA).

Common name	Scientific name	D-loop B.S.S	D-loop O.S.S	D-loop C.S.S	18S rRNA P.A.C
Cattle	<i>Bos taurus</i>	13.29 ± 0.05 <sup>a</sup>	— <sup>b</sup>	—	12.47 ± 0.02
Sheep	<i>Ovis aries</i>	—	15.03 ± 0.03	—	12.94 ± 0.07
Goat	<i>Capra hircus</i>	—	—	18.74 ± 0.29	14.58 ± 0.04
Swine	<i>Sus scrofa domestica</i>	—	—	—	14.54 ± 0.03
Chicken	<i>Gallus gallus</i>	—	—	—	15.61 ± 0.00
Turkey	<i>Meleagris gallipavo</i>	—	—	—	12.68 ± 0.06
Duck	<i>Anas platyrhynchos</i>	—	—	—	14.92 ± 0.00
Goose	<i>Anser anser</i>	—	—	—	15.18 ± 0.01
Horse	<i>Equus caballus</i>	—	—	—	15.07 ± 0.11
Rabbit	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	—	—	—	15.65 ± 0.03
Cat	<i>Felis catus</i>	—	—	—	15.59 ± 0.05
Dog	<i>Canis familiaris</i>	—	—	—	15.96 ± 0.03
Rat	<i>Rattus norvegicus</i>	—	—	—	15.69 ± 0.02
Guinea fowl	<i>Numida meleagris</i>	—	—	—	15.00 ± 0.01
Quail	<i>Coturnix coturnix</i>	—	—	—	12.71 ± 0.03
Pheasant	<i>Phasianus colchicus</i>	—	—	—	15.10 ± 0.04
Ostrich	<i>Struthio camelus</i>	—	—	—	13.81 ± 0.01
Partridge	<i>Alectoris rufa</i>	—	—	—	12.71 ± 0.06
Red deer	<i>Cervus elaphus</i>	—	—	—	12.25 ± 0.07
Roe deer	<i>Capreolus capreolus</i>	—	—	—	12.82 ± 0.03
Mouflon	<i>Ovis ammon</i>	—	—	—	12.11 ± 0.11
Fallow deer	<i>Dama dama</i>	—	—	—	14.76 ± 0.01
Pyrenean ibex	<i>Capra pyrenaica</i>	—	—	—	12.42 ± 0.09
Chamois	<i>Rupicapra rupicapra</i>	—	—	—	15.60 ± 0.02
Wild boar	<i>Sus scrofa scrofa</i>	—	—	—	13.36 ± 0.12
Sardine	<i>Sardina pilchardus</i>	—	—	—	13.29 ± 0.03
Tuna	<i>Thunnus atlanticus</i>	—	—	—	13.12 ± 0.03
Trout	<i>Salmo fario</i>	—	—	—	11.64 ± 0.07
Monk fish	<i>Lophius piscatorius</i>	—	—	—	11.52 ± 0.01
Red mullet	<i>Mullus barbatus</i>	—	—	—	13.46 ± 0.00
Nile perch	<i>Perca fluviatilis</i>	—	—	—	12.31 ± 0.03
Barley	<i>Hordeum vulgare</i>	—	—	—	14.08 ± 0.04
Maize	<i>Zea mays</i>	—	—	—	13.65 ± 0.00
Oat	<i>Avena sativa</i>	—	—	—	12.31 ± 0.04
Soybean	<i>Glycine max</i>	—	—	—	12.97 ± 0.03
Rye	<i>Secale cereale</i>	—	—	—	13.38 ± 0.09
Wheat	<i>Triticum aestivum</i>	—	—	—	13.12 ± 0.04
Sunflower	<i>Helianthus annuus</i>	—	—	—	12.94 ± 0.09
Rice	<i>Oryza sativa</i>	—	—	—	14.88 ± 0.11
Nut	<i>Juglans regia</i>	—	—	—	12.18 ± 0.07
Pistachio	<i>Pistacia vera</i>	—	—	—	15.57 ± 0.03
Almond	<i>Prunus amygdalus</i>	—	—	—	15.04 ± 0.01
Pine nut	<i>Pinus pinea</i>	—	—	—	13.67 ± 0.07
Peanut	<i>Arachis hypogaea</i>	—	—	—	13.67 ± 0.01
Hazelnut	<i>Corylus avellana</i>	—	—	—	12.94 ± 0.08

D-loop B.S.S: bovine-specific system on the D-loop gene (BDLOOPDIR/BDLOOPINV and BDLOOPP).

D-loop O.S.S: ovine-specific system on the D-loop gene (ODLOOPDIR/ODLOOPINV and ODLOOPP).

D-loop C.S.S: caprine-specific system on the D-loop gene (CDLOOPDIR/CDLOOPINV and CDLOOPP).

P.A.C: positive amplification control (18SDIR/18SINV and 18SP) for the bovine, ovine and caprine D-loop systems.

<sup>a</sup> Average  $C_p$  value ± SD shown from triplicate PCR reactions from each DNA extraction.

<sup>b</sup> Indicates no positive signal after 45 PCR cycles.

the 113 blind samples, with  $C_p$  values from  $22.91 \pm 0.06$  to  $35.41 \pm 0.57$ ), in accordance with the feed description (Table 3). As can be seen, the PCR assays specifically detect as low as 0.1% of the corresponding target species material in the analyzed samples. No PCR signal was generated in any of the blind samples (71 of the 113) that were declared as free from bovine and ovine content (results not shown), supporting the ability of the assay to correctly classify the samples as positive or negative for banned target material.

It should be noted that although rendering treatments have an indisputable effect on DNA damage (Arslan, Irfan Ilhak, & Calicioglu, 2006; Hird et al., 2006), positive amplification signals were still observed with the D-loop PCR systems in those feeds subjected to processing temperatures as high as 145 °C (samples S34, S67, S68 and S70). The short length of the selected amplicons minimized possible PCR failures due to DNA degradation.

Contrarily to the bovine and ovine real-time PCR results, none of the blind industrial feeds gave positive signals for caprine content (results not shown). This was in consonance with the feed

composition data provided by the European laboratories reflecting the unavailability of caprine by-product materials for analysis. Although caprine references (C1 and C2) are sensitively detected with the corresponding real-time PCR system (Table 3), the laboratory-scale autoclaving treatment of 133 °C applied to these samples cannot be considered analogous to the EU procedures for the rendering of animal products. Thus, samples representative of real world feed ingredients containing caprine PAPs should be assayed to assess the performance of the method for the detection of this species in feedstuffs.

All the feeds amplified successfully with the 18S rRNA eukaryotic system and, in general, it is observed that  $C_p$  values decrease as sterilization conditions applied to the samples become less severe (results not shown). The use of the positive amplification control offers an indicator of the total PCR-amplifiable eukaryotic DNA present in the samples, being important to assure no false negative results due to the presence of PCR inhibitors in feed matrices or DNA extraction reagents.

**Table 3**

Real-time PCR and extrapolation results obtained with the three D-loop real-time PCR systems (bovine, ovine and caprine) for those industrial feed samples containing different levels of declared target content processed at temperatures from 133 to 145 °C ( $C_p$  values produced using 100 ng DNA).

Samples	Description of industrial feeds		Matrix	PCR systems	Target content (%)	
	Target tissue/T (°C)			$C_p$ value	Declared	Detected
B1 <sup>a</sup>	Bovine (carcase)	133		23.81 ± 0.02	100	133
B2	Bovine (carcase + muscle)	133	Pig feed + chicken PAP <sup>d</sup>	33.81 ± 0.15 <sup>e</sup>	0.1	0.1
B3	Bovine (carcase + muscle)	133	Pig feed + chicken PAP	33.03 ± 0.10	0.2	0.2
B4	Bovine (carcase + muscle)	133	Pig feed + chicken PAP	31.73 ± 0.10	0.5	0.5
B5	Bovine (carcase + muscle)	133	Pig feed + chicken PAP	30.62 ± 0.13	1.0	1.0
S1 <sup>b</sup>	UD (bovine material)	UD	UD	30.45 ± 0.16	0.1	1.2
S9	UD (bovine material)	UD	UD	30.84 ± 0.18	0.1	1.2
S16	UD (bovine material)	UD	UD	27.81 ± 0.08	0.1	7.6
S6	UD (bovine material)	UD	UD	34.29 ± 0.02	0.5	0.1
S11	UD (bovine material)	UD	UD	29.89 ± 0.01	1.0	1.7
S2	UD (bovine material)	UD	UD	29.43 ± 0.08	1.0	2.4
S13	UD (bovine material)	UD	UD	28.13 ± 0.12	1.0	6.1
S28	Bovine (carcase + muscle)	133	Pig feed	34.31 ± 1.44	0.1	0.1
S32	Bovine (carcase + muscle)	133	Pig feed	35.41 ± 0.57	0.1	0.5
S73	Bovine (carcase + muscle)	133	Chicken (soft + bones)	33.84 ± 0.17	0.1	0.1
S78	Bovine (carcase + muscle)	133	Poultry meal	33.97 ± 0.22	0.1	0.1
S83 <sup>c</sup>	Bovine (carcase + muscle)	133	Pork (soft + bones)	32.52 ± 0.13	0.08	0.3
S30	Bovine (carcase + muscle)	133	Pig feed	32.82 ± 0.25	0.2	0.2
S74	Bovine (carcase + muscle)	133	Chicken feed	30.67 ± 0.31	0.2	1.0
S82	Bovine (carcase + muscle)	133	Pig feed	32.46 ± 0.11	0.2	0.3
S29	Bovine (carcase + muscle)	133	Pig feed	32.83 ± 0.25	0.3	0.2
S72 <sup>c</sup>	bovine (carcase + muscle)	133	Aquafeed	28.76 ± 0.07	0.4	3.9
S27	Bovine (carcase + muscle)	133	Pig feed	32.24 ± 0.20	0.5	0.3
S75	Bovine (carcase + muscle)	133	Pig feed + chicken PAP	30.45 ± 0.09	0.5	1.2
S84 <sup>c</sup>	Bovine (carcase + muscle)	133	Pork (soft + bones)	29.23 ± 0.14	0.8	2.8
S26	Bovine (carcase + muscle)	133	Pig feed	29.32 ± 0.13	1.0	2.6
S33	Bovine (carcase + muscle)	133	Pig feed	30.92 ± 0.08	1.0	4.9
S69	Bovine (carcase + muscle)	133	Pork (soft + bones)	29.40 ± 0.03	1.0	2.5
S80	Bovine (carcase + muscle)	133	Chicken feed + porcine PAP	27.07 ± 0.18	1.0	2.5
S86	Bovine (carcase + muscle)	133	Pork greaves meal	28.11 ± 0.08	1.0	6.1
S85 <sup>c</sup>	Bovine (carcase + muscle)	133	Pork (soft + bones)	27.95 ± 0.25	1.6	6.9
S87	Bovine (carcase + muscle)	133	Pork greaves meal	27.11 ± 0.10	2.0	12.4
S25	Bovine (carcase + muscle)	133	Pig feed	27.47 ± 0.22	5.0	9.6
S109	Bovine (carcase + muscle)	133	Pig feed	26.22 ± 0.01	5.0	26.3
S81	Bovine (carcase)	137	Porcine PAP	33.87 ± 0.35	0.5	0.2
S65	Bovine (carcase)	141	Porcine carcase	32.39 ± 0.43	1.0	0.2
S66	Bovine (carcase)	141	Porcine carcase	31.89 ± 0.10	2.0	0.5
S67	Bovine (carcase)	145	Porcine carcase	33.44 ± 0.22	1.0	0.2
S68	Bovine (carcase)	145	Porcine carcase	32.34 ± 0.05	2.0	0.3
S34	Bovine (carcase)	145		28.41 ± 0.06	100	50
S79	Bovine (muscle)	141	Porcine carcase	31.01 ± 0.07	1.0	0.5
S70	Bovine (muscle)	145	Porcine PAP	33.70 ± 0.30	1.0	0.1
O1	Ovine (carcase + muscle)	133	Chicken feed + pork (soft + bones)	28.72 ± 0.08	5.0	6.0
O2	Ovine (carcase + muscle)	133	Chicken feed + pork (soft + bones)	32.01 ± 0.28	1.0	0.7
O3	Ovine (carcase + muscle)	133	Chicken feed + pork (soft + bones)	32.70 ± 0.61	0.5	0.5
O4	Ovine (carcase + muscle)	133	Chicken feed + pork (soft + bones)	33.31 ± 0.43	0.3	0.3
O5	Ovine (carcase + muscle)	133	Chicken feed + pork (soft + bones)	33.51 ± 0.37	0.2	0.3
O6	Ovine (carcase + muscle)	133	Chicken feed + pork (soft + bones)	35.15 ± 0.61	0.1	0.1
S44	Ovine (carcase + muscle)	133	Pig feed	31.62 ± 0.20	0.1	0.9
S83	Ovine (carcase + muscle)	133	Pork (soft + bones)	33.57 ± 0.54	0.02	0.3
S72	Ovine (carcase + muscle)	133	Aquafeed	32.77 ± 0.46	0.1	0.4
S84	Ovine (carcase + muscle)	133	Pork (soft + bones)	34.90 ± 0.96	0.2	0.1
S85	Ovine (carcase + muscle)	133	Pork (soft + bones)	29.42 ± 0.20	0.4	3.8
S43	Ovine (carcase + muscle)	133	Pig feed	28.43 ± 0.31	1.0	7.2
S88	Ovine (carcase)	133	Feather meal	28.14 ± 0.08	0.1	8.7
S42	Ovine (carcase)	133		23.63 ± 0.06	100	160
S108	Ovine (carcase)	133		22.91 ± 0.06	100	255
C1	Caprine (muscle)	133	Oat	27.20 ± 0.02	0.1	
C2	Caprine (muscle)	133	Oat	24.85 ± 0.08	1	

UD: undetermined (no information supplied).

Samples S1 to S16 were provided by the Centre Wallon de Recherches Agronomiques "CRA-W" (Belgium). Reference and blind samples from S17 to S113 were provided by the Co-operative Central Laboratory "CCL-Nutricontrol" (The Netherlands). Samples C1 and C2 were prepared at the Department of Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos (Spain). Blind samples are rearranged in the table according to temperature, matrix and target percentage characteristics.

<sup>a</sup> Reference samples (B: bovine; O: ovine; C: caprine), showed in bold-face type.

<sup>b</sup> Blind samples (S1 to S113; only positive samples are reflected in the table).

<sup>c</sup> S83, S72, S84, and S85 correspond to 0.1, 0.5, 1 and 2% RR1 samples, respectively. RR1 consists of ruminant PAP (60% bovine carcase, 20% ovine carcase, 15% bovine muscle, 5% ovine muscle).

<sup>d</sup> PAP: processed animal protein.

<sup>e</sup> Average  $C_p$  value ± SD shown from triplicate PCR reactions from each DNA extraction.

### 3.3. Quantitative capability of the assay

In light of the results described above, it is possible to conclude that the real-time PCR method developed evidences a high skill in terms of qualitative detection of bovine and ovine PAPs in feedstuffs. However, on account of the widely reported quantitative potential of real-time PCR assays (Heid, Stevens, Livak, & Williams, 1996; Rodríguez et al., 2005), a further step of this study consisted in determining whether the assay was able to quantify the concentration of banned ruminant (bovine and ovine) PAPs in an unknown feed. Quantification analyses are performed by comparing the amplification ( $C_p$ ) of a target mtDNA sequence in an unknown (blind) sample with a calibration curve prepared with known (reference) concentrations of the same target in the sample. In the work herein developed, bovine and ovine reference calibration curves were constructed and analyzed statistically as a first benchmark for judging the quantitative performance of the assay. Subsequently, extrapolation analysis of the blind sample  $C_p$  results was carried out using the corresponding calibration curve equations to determine whether the detected ruminant content (%) of each sample fitted with the declared (real) one.

#### 3.3.1. Calibration curves and statistical analysis

Two arrays of matrix-matched bovine (samples B2–B5) and ovine (samples O1–O6) reference feeds subjected to identical temperature processing (133 °C) and containing increasing amounts of the target MBM were used to construct the calibration curves using a simple regression model with the log input DNA concentration versus the  $C_p$  (Fig. 1). As shown in the figure, the resulting slopes of the linear equations are  $-3.26$  for D-loop bovine-specific system (Fig. 1A) and  $-3.56$  for D-loop ovine-specific system (Fig. 1B), being near to the slope's value of  $-3.32$  corresponding to a 100% PCR efficiency. The theoretical detection limit for the species-specific PCR systems was also calculated from the standard curves shown in Fig. 1. The detection limit for each species-specific system was estimated from the corresponding curves as the DNA amount yielding a  $C_p$  value of 45. These values are  $4.11 \times 10^{-5}$  ng and  $1.60 \times 10^{-4}$  ng for bovine and ovine-specific systems, respectively.

$C_p$  values obtained from bovine and ovine calibration curves, plotted against the logarithm of the DNA concentrations, were used to test the sensitivity of the real-time PCR method. Fig. 1 also shows the discriminating capacity, which is the least difference in logarithm of target DNA concentration in the sample that the analytical method can discriminate with a significant level. Linearity of the bovine and ovine real-time PCR response was also analyzed. In each PCR system, the following parameters were evaluated: (a) Cochran's test, which determined whether the variances of the responses obtained for each concentration of bovine or ovine DNA in the reference feeds were homogeneous, (b) regression analysis and (c) variance analysis with lack of-fit. All parameters were evaluated following previously described validation protocols (Camacho et al., 1993; Fajardo et al., 2009; ICH, 2005).

The accuracy of the bovine and ovine assays was determined from the four bovine PAP percentages (0.1, 0.2, 0.5 and 1%) and the six ovine PAP percentages (0.1, 0.2, 0.3, 0.5, 1 and 5%) of reference samples. Accuracy is reported as percentage recovery by the assay of known added amounts of analyte. Using the Snedecor *F*-test, it was verified that the concentration of DNA present in a sample did not affect the variation of the results. The values for Student's *t*-test obtained demonstrated that the method was accurate, since no significant differences between 100% and the mean recovery values were detected. The influence of day of analysis on the precision of the assay was also tested by comparing the coefficients of variation (CV) of three separate DNA extractions performed on the 0.1%

bovine and ovine PAPs, analyzed in duplicate three times on the same day, versus the values obtained for the same samples on three different days. Results showed significant differences with higher CV values when the assay was done on different days with respect to the same day. Thus, a standard curve should be determined on each day of analysis.

#### 3.3.2. Blind sample analysis

To assess the quantification ability of the assay, extrapolation analysis of the  $C_p$  data obtained for blind feeds was carried out using the linear regression equations of the reference curves. Table 3 shows the average  $C_p$  values obtained for all the ruminant-positive blind samples, together with the correlation between the actual (declared) target content and the content estimated for these feeds by substitution of the  $C_p$ s in the corresponding bovine and ovine equations. It is observed that for the bovine (B2–B5) and ovine (O1–O6) reference samples, which contain the target PAPs mixed in identical matrices and processed homogeneously at 133 °C, the estimated bovine and ovine content was identical or very close to the declared one. In contrast, heterogeneous extrapolation behaviour is observed for the majority of the blind feeds, resulting in discordances between the declared target content and the detected one. The described results bring up the issue that, although the real-time PCR technique developed has quantitative potential, there are two global factors that make the quantification of MBM in feeds unattainable. The first one is related with the existing variability in terms of processing conditions of the feeds, which affect the amount and quality of amplifiable DNA. Because European legislation only specifies minimum treatment requirements, the real temperature and pressure conditions will vary amongst the different rendering systems and the exact impact of sterilization cannot be established. Secondly, the mixed proportions of vegetal and animal ingredients in compound feeds, including the different kind of MBM that can be present (carcasses, muscle, bones, etc.), also affect quantification results because the number of cells and, consequently, of target mtDNA, will vary considerably depending on the type and origin of the tissue. As consequence, the  $C_p$  value measured on a blind feedstuff would only be useable for a quantitative estimate of the target species content if identical MBM in terms of composition and processing treatment are available for the preparation of suitable calibration standards, which is not feasible from a practical point of view. These observations are in line with results obtained by other authors (Fajardo et al., 2009; Prado et al., 2009) regarding the limitations of real-time PCR for quantification of species in food and feed.

The degree of contamination of animal feed with prohibited material, whether fraudulent or accidental, can be low and, therefore, detection methods should provide a selective and sensitive detection level. One of the achievements of the assay described in this work is the ability to specifically detect as low as 0.1% of banned bovine and ovine PAPs in feeds, which is an optimal detection limit in consonance with the official method based on optical microscopy for the detection of MBM in feedingstuffs (European Commission, 2009). Other real-time PCR approaches report similar or higher detection levels when attempting the identification of different ruminant or other mammalian material in feeds (Frezza et al., 2007; Prado et al., 2009; Tartaglia et al., 1998; Woodgate, van den Hoven, Vaessen, & Margry, 2009). Moreover, the industrial feeds analyzed in this work are all representative of the real world feed ingredients and processing treatments dictated by European regulations, which adds significant value when compared with other PCR-based assays using laboratory-scale prepared samples that do not reproduce the rendering processes of commercial feeds. As previously noted, further analysis with real

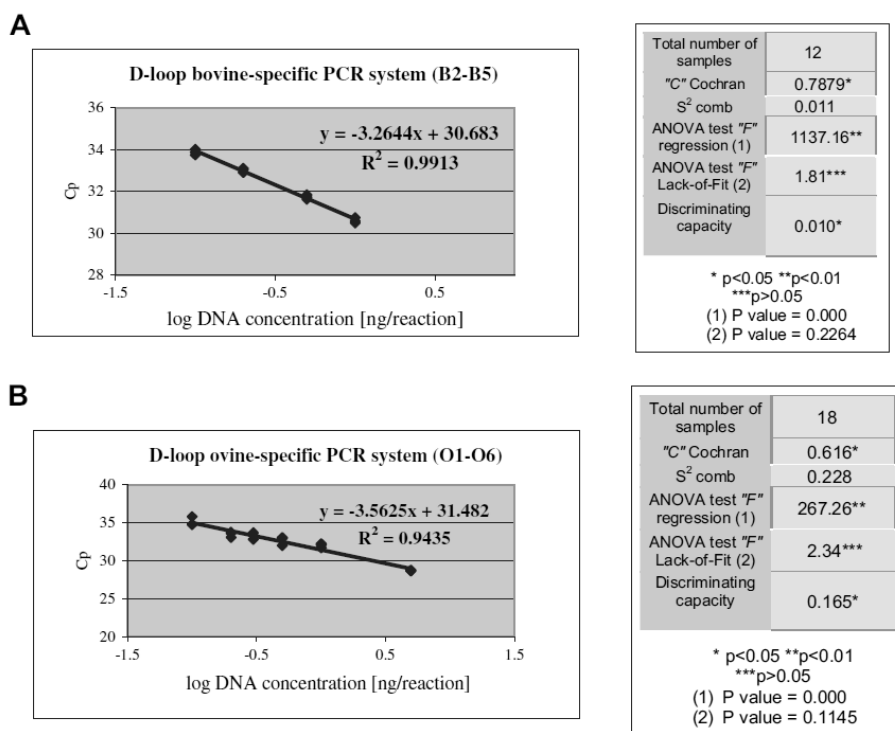


Fig. 1.  $C_q$  values obtained from D-loop bovine (A), and D-loop ovine (B) reference samples, plotted versus the logarithm of the DNA concentrations. Linearity test, regression line and sensitivity parameters are calculated for each species-specific PCR system.

feed ingredients containing caprine PAPs would be necessary to validate the detection of this species in feedstuffs.

In spite of the mentioned benefits, one of the reported drawbacks of PCR is linked to the fact that authorized feed ingredients (e.g. milk products or animal fats) may also be sources of animal DNA. Such DNA presence may hence lead to false positive results from a legal point of view, although it would not reflect non-compliance with the feed ban from a scientific perspective (Bellorini et al., 2005; Prado et al., 2007). According to the supplier's information, the feeds analyzed in this work do not seem to contain any permitted ingredient susceptible of generating a positive signal due to DNA amplification with the species-specific PCR systems. In this context, careful judgment of the sample information such as feed ingredients, source of production or feeding practices with the assay results is required before any experienced analyst can decide whether feed ban violation has occurred. Real-time PCR methods are universally used and can be integrated in a global analytical strategy with other methods applied in the UE (e.g. near infrared microscopy and imaging or immunology) to determine if the presence of animal constituents in feed is conform or not to the European legislation (Cawthraw et al., 2009; Fumière et al., 2010).

#### 4. Conclusions

In summary, the use of the real-time PCR developed in this work to detect bovine, ovine and caprine PAPs in feeds is limited to deliver a qualitative result on the presence or absence of the target species. Even when not applied for quantitative purposes, the potential and robustness of the described real-time PCR procedure to detect small amounts of bovine, ovine and caprine prohibited material in farmed animal feed make it a reliable and useful diagnostic tool to enforce BSE control measures.

#### Acknowledgements

The authors are indebted to CCL-Nutricontrol (The Netherlands) and CRA-W (Belgium) for kindly providing us with the industrial feed samples analyzed in this study. This work was supported by the Programa de Vigilancia Sanitaria 2009/AGR/1489 of the Comunidad de Madrid (Spain) and by a project (AGL2007/60077) from the Ministerio de Ciencia e Innovación (Spain). Nicolette Pegels is recipient of a fellowship from the Ministerio de Ciencia e Innovación (Spain).

#### References

- Arslan, A., Irfan Ilhak, O., & Calicioglu, M. (2006). Effect of method of cooking on identification of heat processed beef using polymerase chain reaction (PCR) technique. *Meat Science*, 72, 326–330.
- Bellorini, S., Strathmann, S., Baeten, V., Fumière, O., Berben, G., Tirendi, S., et al. (2005). Discriminating animal fats and their origins: assessing the potentials of Fourier transform infrared microscopy, gas chromatography, immunoassay and polymerase chain reaction techniques. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 382, 1073–1083.
- Camacho, M. A., Torres, A. I., Gil-Alegre, M. E., Obregón, M. M., & Ruz, V. (1993). Validation protocol of analytical methods for finished pharmaceutical products. *STP Pharma Pratiques*, 3, 197–202.
- Cawthraw, S., Saunders, G. C., Martin, T. C., Sawyer, J., Windl, O., & Readney, S. D. (2009). Real-time PCR detection and identification of prohibited mammalian and avian material in animal feeds. *Journal of Food Protection*, 72, 1055–1062.
- Colgan, S., O'Brien, L., Maher, M., Shilton, N., McDonnell, K., & Ward, S. (2001). Development of a DNA-based assay for species identification in meat and bone meal. *Food Research International*, 34, 409–414.
- Dalmasso, A., Fontanella, E., Piatti, P., Civera, T., Rosati, S., & Bottero, M. T. (2004). A multiplex PCR assay for the identification of animal species in feedstuffs. *Molecular and Cellular Probes*, 18, 81–87.
- De la Roza-Delgado, B., Soldado, A., Martínez-Fernández, A., Vicente, F., Garrido-Varo, A., Pérez-Marín, D., et al. (2007). Application of near-infrared microscopy (NIRM) for the detection of meat and bone meals in animal feeds: a tool for food and feed safety. *Food Chemistry*, 105, 1164–1170.



- European Commission. (2005). The TSE roadmap. COM(2005) 322 FINAL. [http://ec.europa.eu.int/comm/food/biosafety/bse/roadmap\\_en.pdf](http://ec.europa.eu.int/comm/food/biosafety/bse/roadmap_en.pdf).
- European Commission. (2006). Commission Regulation 1923/2006/EC of 18 December 2006 amending Regulation 999/2001/EC laying down rules for the prevention, control and eradication of certain transmissible spongiform encephalopathies. *Official Journal of European Communities*, L 404, 1–8.
- European Commission. (2009). Commission Regulation 2009/152/EC of 27 January 2009 laying down the methods of sampling and analysis for the official control of feed. *Official Journal of European Communities*, L 54, 1–130.
- Fajardo, V., González, I., Martín, I., Rojas, M., Hernández, P. E., García, T., et al. (2009). A LightCycler TaqMan PCR assay for quantitative detection of chamois (*Rupicapra rupicapra*) and Pyrenean ibex (*Capra pyrenaica*) in experimental meat mixtures. *International Journal of Food Science and Technology*, 44, 1997–2004.
- Frezza, D., Favaro, M., Vaccari, G., von Holst, C., Giambra, V., Anklam, E., et al. (2003). A competitive polymerase chain reaction-based approach for the identification and semiquantification of mitochondrial DNA in differently heat-treated bovine meat and bone meal. *Journal of Food Protection*, 66, 103–109.
- Frezza, D., Giambra, V., Chegdani, F., Fontana, C., Maccabiani, G., Losio, N., et al. (2007). Standard and Light-Cycler PCR methods for animal DNA species detection in animal feedstuffs. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 9, 18–23.
- Fumière, O., Dubois, M., Baeten, V., von Holst, C., & Berben, G. (2006). Effective PCR detection of animal species in highly processed animal byproducts and compound feeds. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 385, 1045–1055.
- Fumière, O., Veys, P., Boix, A., von Holst, C., Baeten, V., & Berben, G. (2010). Methods of detection, species identification and quantification of processed animal proteins in feedingstuffs. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, 13, 59–70.
- Girish, P. S., Anjaneyulu, A. S. R., Viswas, K. N., Anand, M., Rajkumar, N., Shivakumar, B. M., et al. (2004). Sequence analysis of mitochondrial 12S rRNA gene can identify meat species. *Meat Science*, 66, 551–556.
- Heid, C. A., Stevens, J., Livak, K. J., & Williams, P. M. (1996). Real time quantitative PCR. *Genome Research*, 6, 986–994.
- Hird, H., Chisholm, J., Sánchez, A., Hernández, M., Goodier, R., Schneede, K., et al. (2006). Effect of heat and pressure processing on DNA fragmentation and implications for the detection of meat using a real-time polymerase chain reaction. *Food Additives and Contaminants*, 23, 645–650.
- International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH). (2005). Harmonised tripartite guideline. Validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1). Available at <http://drugtiger.com/d/gdoc/media417.pdf>.
- Krcmár, P., & Rencová, E. (2001). Identification of bovine-specific DNA in feedstuffs. *Journal of Food Protection*, 64, 117–119.
- Martín, I., García, T., Fajardo, V., Rojas, M., Hernández, P. E., González, I., et al. (2008). Real-time PCR for quantitative detection of bovine tissues in food and feed. *Journal of Food Protection*, 71, 564–572.
- Martín, I., García, T., Fajardo, V., Rojas, M., Pegels, N., Hernández, P. E., et al. (2009). SYBR-Green real-time PCR approach for the detection and quantification of pig DNA in feedstuffs. *Meat Science*, 82, 252–259.
- Prado, M., Fumière, O., Boix, A., Marien, A., Berben, G., & von Holst, C. (2007). Detection of ruminant meat and bone meals in animal feed by real-time polymerase chain reaction: result of an interlaboratory study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 7495–7501.
- Prado, M., Fumière, O., Boix, A., Marien, A., Berben, G., & von Holst, C. (2009). Novel approach for interlaboratory transfer of real-time PCR methods: detecting bovine meat and bone meal in feed. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 394, 1423–1431.
- Rodríguez, M. A., García, T., González, I., Asensio, L., Hernández, P. E., & Martín, R. (2005). Taqman real-time PCR for the detection and quantitation of pork in meat mixtures. *Meat Science*, 70, 113–120.
- Sbisà, E., Tanzariello, F., Reyes, A., Pesole, G., & Saccone, C. (1997). Mammalian mitochondrial D-loop region structural analysis: identification of new conserved sequences and their functional and evolutionary implications. *Gene*, 205, 125–140.
- Tartaglia, M., Saulle, E., Pestalozza, S., Morelli, L., Antonucci, G., & Battaglia, P. A. (1998). Detection of bovine mitochondrial DNA in ruminant feeds: a molecular approach to test for the presence of bovine-derived materials. *Journal of Food Protection*, 61, 513–518.
- Toyoda, A., Nakajo, M., Kawachi, H., Matsui, T., & Yano, H. (2004). PCR detection of bovine mitochondrial DNA derived from meat and bone meal in feed. *Journal of Food Protection*, 67, 2829–2832.
- Van Raamsdonk, L. W. D., von Holst, C., Baeten, V., Berben, G., Boix, A., & de Jong, J. (2007). New developments in the detection and identification of processed animal proteins in feeds. *Animal Feed Science and Technology*, 133, 63–83.
- Woodgate, S. L., van den Hoven, S., Vaessen, J., & Margry, R. (2009). Control tools to detect processed animal proteins in feed and in animal by-products: specificity and challenges. *Biotechnology, Agronomy Society and Environment*, 13, 9–13.

## Detection of Banned Ruminant-Derived Material in Industrial Feedstuffs by TaqMan Real-Time PCR Assay

NICOLETTE PEGELS, ISABEL GONZÁLEZ,\* TERESA GARCÍA, AND ROSARIO MARTÍN

*Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain*

MS 11-029; Received 21 January 2011/Accepted 26 March 2011

### ABSTRACT

A ruminant-specific real-time PCR system was designed and applied for the detection of processed animal protein from ruminants in industrial feedstuffs. The assay includes a primer pair and a TaqMan probe selectively targeting mitochondrial 16S rRNA gene sequences from the ruminant group and another primer-probe set based on the eukaryotic nuclear 18S rRNA gene (positive amplification control). Both ruminant and eukaryotic PCR systems generated short PCR amplicons of 79 and 77 bp, respectively. To evaluate the suitability of the real-time PCR assay for the detection of banned by-products of ruminant origin, 126 feed samples subjected to rendering under current European legislation regulations were analyzed. The assay achieved 100% success in classifying the samples as positive or negative in terms of qualitative ruminant composition, with a detection limit of 0.1%. The quantitative ability of the assay is however restricted by variations in the composition and treatment of the feeds, which affect the amount and quality of amplifiable DNA.

Outbreaks of bovine spongiform encephalopathy have garnered enormous political and scientific attention, and this disease has spread around the world through animal feed containing infected meat and bone meal (MBM) (13). This spread has focused attention on the need for adequate control of the production and supply of animal feeds to make sure they are safe for consumers. A permanent ban on MBM in feed for all farm animals is currently in force in the European Union (EU) (11). In 2005, the European Commission (11) specified that a restricted use of animal proteins for nonruminants would be considered if methods for the identification of ruminant MBM and their differentiation from MBM from other species became available (25). Because microscopic examination, which is the only official method for the detection of prohibited animal proteins (12), does not allow such differentiation of the species of origin, a simple, specific, and highly sensitive analytical method for identification of ruminant MBM in animal feed is needed (14, 29).

Immunochemical methods have been used for species verification (3, 8), but for feedstuffs, denaturation of target proteins during the rendering process may hamper the analyses (24). The limitations associated with current microscopic and immunological methods in terms of sensitivity and specificity have prompted the development of alternative techniques based on the use of DNA as an analyte, such as the PCR (15, 18, 24, 25). Among the advantages of PCR-based techniques, two are pertinent to

feedstuffs analysis: (i) the stability of DNA at the high temperatures used in the rendering industry and (ii) DNA sequence variability, which can be used to specifically identify the species of origin for material in a defined matrix (10, 20). Evolution of PCR technology has resulted in the development of highly reliable real-time PCR assays applicable to species identification in food and feed (1, 4, 7, 9, 14, 16, 32). Real-time PCR allows accurate and rapid detection of very small amplification products from thermally degraded feed DNA, providing the analyses with automation and large-scale processing potential in compliance with EU legislation (24).

The objective of the present work was the development and evaluation of a TaqMan real-time PCR assay for the detection of ruminant DNA in feeds, targeting short mitochondrial 16S rRNA sequences specific to ruminants. The assay was used to analyze 126 feed samples for the presence of banned ruminant-derived ingredients. The analyzed samples were processed in a manner similar to the rendering processes applied to commercial feedstuffs destined for farmed animals.

### MATERIALS AND METHODS

**Sample selection and DNA extraction.** Feed samples used in this study (industrial feeds in Table 2) were provided by the Centre Wallon de Recherches Agronomiques (CRA-W; Gembloux, Belgium) and the Cooperative Central Laboratory (CCL-Nutricontrol, Veghel, The Netherlands). Feeds consisted of various processed animal proteins (PAPs; ruminant and nonruminant), either alone or in a mixed feed matrix, and were manufactured following European legislation to reproduce the real-world feed rendering processes and ingredients. A batch of 119 blind samples

\* Author for correspondence. Tel: 34-913943751; Fax: 34-913943743; E-mail: gonzalzi@vet.ucm.es.

TABLE 1. Specificity of the real-time PCR system

Common name	Scientific name	Mean $\pm$ SD $C_p^a$	
		16S rRNA RSS	PAC
Cattle	<i>Bos taurus</i>	15.17 $\pm$ 0.02	16.65 $\pm$ 0.03
Sheep	<i>Ovis aries</i>	17.02 $\pm$ 0.01	15.03 $\pm$ 0.04
Goat	<i>Capra hircus</i>	14.89 $\pm$ 0.03	15.45 $\pm$ 0.04
Red deer	<i>Cervus elaphus</i>	23.99 $\pm$ 0.03	17.91 $\pm$ 0.02
Roe deer	<i>Capreolus capreolus</i>	22.31 $\pm$ 0.05	15.35 $\pm$ 0.05
Mouflon	<i>Ovis ammon</i>	18.36 $\pm$ 0.02	14.62 $\pm$ 0.02
Fallow deer	<i>Dama dama</i>	22.20 $\pm$ 0.03	14.76 $\pm$ 0.01
Pyrenean ibex	<i>Capra pyrenaica</i>	13.43 $\pm$ 0.01	14.84 $\pm$ 0.07
Chamois	<i>Rupicapra rupicapra</i>	25.60 $\pm$ 0.02	17.84 $\pm$ 0.04
Swine	<i>Sus scrofa domestica</i>	—	17.54 $\pm$ 0.06
Chicken	<i>Gallus gallus</i>	—	15.59 $\pm$ 0.00
Turkey	<i>Meleagris gallipavo</i>	—	12.65 $\pm$ 0.01
Duck	<i>Anas platyrhynchos</i>	—	14.80 $\pm$ 0.00
Goose	<i>Anser anser</i>	—	15.16 $\pm$ 0.06
Horse	<i>Equus caballus</i>	—	18.33 $\pm$ 0.05
Rabbit	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	—	15.27 $\pm$ 0.00
Cat	<i>Felis catus</i>	—	15.72 $\pm$ 0.07
Dog	<i>Canis familiaris</i>	—	15.16 $\pm$ 0.01
Rat	<i>Rattus norvegicus</i>	—	15.88 $\pm$ 0.05
Guinea fowl	<i>Numida meleagris</i>	—	14.87 $\pm$ 0.03
Quail	<i>Coturnix coturnix</i>	—	12.55 $\pm$ 0.03
Pheasant	<i>Phasianus colchicus</i>	—	15.97 $\pm$ 0.04
Ostrich	<i>Struthio camelus</i>	—	14.84 $\pm$ 0.01
Partridge	<i>Alectoris rufa</i>	—	11.86 $\pm$ 0.09
Wild boar	<i>Sus scrofa scrofa</i>	—	15.87 $\pm$ 0.09
Sardine	<i>Sardina pilchardus</i>	—	13.48 $\pm$ 0.07
Tuna	<i>Thunnus atlanticus</i>	—	13.07 $\pm$ 0.01
Trout	<i>Salmo fario</i>	—	13.18 $\pm$ 0.04
Monk fish	<i>Lophius piscatorius</i>	—	11.53 $\pm$ 0.08
Red mullet	<i>Mullus barbatus</i>	—	11.66 $\pm$ 0.01
Nile perch	<i>Perca fluviatilis</i>	—	12.20 $\pm$ 0.02
Barley	<i>Hordeum vulgare</i>	—	13.23 $\pm$ 0.10
Maize	<i>Zea mays</i>	—	13.04 $\pm$ 0.02
Oat	<i>Avena sativa</i>	—	12.28 $\pm$ 0.02
Soybean	<i>Glycine max</i>	—	12.99 $\pm$ 0.03
Rye	<i>Secale cereale</i>	—	13.29 $\pm$ 0.07
Wheat	<i>Triticum aestivum</i>	—	13.22 $\pm$ 0.06
Sunflower	<i>Helianthus annuus</i>	—	11.07 $\pm$ 0.01
Rice	<i>Oryza sativa</i>	—	14.78 $\pm$ 0.03
Nut	<i>Juglans regia</i>	—	13.96 $\pm$ 0.06
Pistaccio	<i>Pistacia vera</i>	—	16.60 $\pm$ 0.08
Almond	<i>Prunus amygdalus</i>	—	15.30 $\pm$ 0.04
Pine nut	<i>Pinus pinea</i>	—	13.79 $\pm$ 0.01
Peanut	<i>Arachis hypogaea</i>	—	13.80 $\pm$ 0.08
Hazelnut	<i>Corylus avellana</i>	—	12.23 $\pm$ 0.01

<sup>a</sup>  $C_p$  values were obtained from 100 ng of DNA. Values are of triplicate reactions from each DNA extraction. Minus sign indicates no positive signal after 50 PCR cycles. 16S rRNA RSS, ruminant-specific system on the 16S rRNA gene (*RUM16SDIR/RUM16SINV* and *RUM16SP*); PAC, positive amplification control (*18SDIR/18SINV* and *18SP*).

containing various concentrations of ruminant and nonruminant PAPs was analyzed. As reference samples, five industrial feeds containing known concentrations of ruminant material (0.1, 0.5, 1, 2, and 5%) were included in the analyses. Because these reference samples contained bovine and ovine but no caprine ingredients, two experimentally prepared binary mixtures of caprine tissue (0.1 and 1%) in a plant matrix (oat) also were used as reference

controls. A wide range of nontarget animal and plant species (Table 1) were tested in the assays as specificity controls.

Genomic DNA was obtained from 200 mg of each feed sample using the Wizard DNA Clean-up System kit (Promega, Madison, WI) as described by Rojas et al. (26). DNA concentration was measured with an ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies Inc., Montchanin, DE). Three DNA replicate

TABLE 2. Real-time PCR assay results for industrial feed samples using the 16S rRNA ruminant-specific system (RSS) and the 18S rRNA positive amplification control (PAC)

Code <sup>a</sup>	Origin <sup>b</sup>	Sample description <sup>c</sup>	Real-time PCR results (Cp) <sup>d</sup>	
			RSS	PAC
R1	CCL	<b>0.1% RR1</b> 133°C in porcine (S+B) 133°C	33.39 ± 0.01	17.23 ± 0.09
R2	CCL	<b>0.5% RR1</b> 133°C in porcine (S+B) 133°C	30.97 ± 0.03	17.98 ± 0.07
R3	CCL	<b>1% RR1</b> 133°C in porcine (S+B) 133°C	29.35 ± 0.02	17.56 ± 0.06
R4	CCL	<b>2% RR1</b> 133°C in porcine (S+B) 133°C	28.66 ± 0.06	18.75 ± 0.01
R5	CCL	<b>5% RR1</b> 133°C in porcine (S+B) 133°C	27.30 ± 0.05	17.03 ± 0.01
C1	NBTA	<b>0.1% caprine</b> muscle 133°C in oat 133°C	29.08 ± 0.02	12.98 ± 0.04
C2	NBTA	<b>1% caprine</b> muscle 133°C in oat 133°C	26.73 ± 0.06	12.54 ± 0.05
S1	CCL	<b>100% bovine</b> carcass 133°C	25.69 ± 0.01	22.87 ± 0.03
S2	CCL	<b>0.1% bovine</b> (C+M) 133°C in pig feed + 5% chicken PAP	35.99 ± 0.07	13.03 ± 0.04
S3	CCL	<b>0.2% bovine</b> (C+M) 133°C in pig feed + 5% chicken PAP	34.30 ± 0.01	13.76 ± 0.02
S4	CCL	<b>0.5% bovine</b> (C+M) 133°C in pig feed + 5% chicken PAP	33.89 ± 0.05	13.99 ± 0.01
S5	CCL	<b>1% bovine</b> (C+M) 133°C in pig feed + 5% chicken PAP	30.56 ± 0.01	13.23 ± 0.04
S6	CCL	<b>5% ovine</b> (C+M) 133°C in chicken feed + 5% pork (S+B) 133°C	30.62 ± 0.10	13.19 ± 0.00
S7	CCL	<b>1% ovine</b> (C+M) 133°C in chicken feed + 5% pork (S+B) 133°C	34.05 ± 0.08	14.14 ± 0.04
S8	CCL	<b>0.5% ovine</b> (C+M) 133°C in chicken feed + 5% pork (S+B) 133°C	35.36 ± 0.06	13.32 ± 0.01
S9	CCL	<b>0.3% ovine</b> (C+M) 133°C in chicken feed + 5% pork (S+B) 133°C	35.76 ± 0.03	13.81 ± 0.05
S10	CCL	<b>0.2% ovine</b> (C+M) 133°C in chicken feed + 5% pork (S+B) 133°C	37.87 ± 0.07	12.97 ± 0.01
S11	CCL	<b>0.1% ovine</b> (C+M) 133°C in chicken feed + 5% pork (S+B) 133°C	39.37 ± 0.10	12.96 ± 0.03
S12	CRAW	<b>0.1% bovine</b> material	32.67 ± 0.03	11.14 ± 0.02
S13	CRAW	<b>1% bovine</b> material	30.91 ± 0.09	12.35 ± 0.06
S14	CRAW	0.1% porcine material	—	11.70 ± 0.03
S15	CRAW	1% porcine material	—	11.32 ± 0.06
S16	CRAW	0.1% porcine material	—	11.73 ± 0.05
S17	CRAW	<b>0.25% bovine</b> MBM + 0.25% porcine MBM	37.11 ± 0.08	13.55 ± 0.03
S18	CRAW	Blank feed	—	12.30 ± 0.02
S19	CRAW	No bovine, no porcine feed	—	13.34 ± 0.02
S20	CRAW	<b>0.1% bovine</b> MBM	31.79 ± 0.01	11.30 ± 0.04
S21	CRAW	No bovine, no porcine feed	—	12.72 ± 0.00
S22	CRAW	<b>1% bovine</b> material	32.80 ± 0.00	12.51 ± 0.00
S23	CRAW	0.2% porcine MBM	—	11.87 ± 0.02
S24	CRAW	<b>1% bovine</b> material	32.02 ± 0.09	11.81 ± 0.00
S25	CRAW	1% porcine material	—	12.01 ± 0.03
S26	CRAW	Blank feed	—	13.88 ± 0.02
S27	CRAW	<b>0.1% bovine</b> material	29.61 ± 0.08	11.80 ± 0.02
S28	CCL	0.5% avian carcass 133°C in porcine protein	—	29.23 ± 0.01
S29	CCL	100% chicken soft tissue 159°C	—	20.20 ± 0.04
S30	CCL	100% chicken bones 159°C	—	20.01 ± 0.09
S31	CCL	100% chicken (bones + muscle) 133°C	—	20.77 ± 0.05
S32	CCL	100% pork soft tissue 159°C	—	28.66 ± 0.02
S33	CCL	100% pork bones 159°C	—	26.35 ± 0.01
S34	CCL	5% chicken (S+B) 133°C in pig feed	—	13.61 ± 0.02
S35	CCL	1% chicken (S+B) 133°C in pig feed	—	13.19 ± 0.02
S36	CCL	<b>5% bovine</b> (C+M) 133°C in pig feed	27.42 ± 0.01	12.73 ± 0.01
S37	CCL	<b>1% bovine</b> (C+M) 133°C in pig feed	29.72 ± 0.06	13.14 ± 0.03
S38	CCL	<b>0.5% bovine</b> (C+M) 133°C in pig feed	32.90 ± 0.04	13.03 ± 0.01
S39	CCL	<b>0.1% bovine</b> (C+M) 133°C in pig feed	36.02 ± 0.14	14.04 ± 0.13
S40	CCL	<b>0.3% bovine</b> (C+M) 133°C in pig feed	33.04 ± 0.04	13.00 ± 0.00
S41	CCL	<b>0.2% bovine</b> (C+M) 133°C in pig feed	36.08 ± 0.05	14.06 ± 0.00
S42	CCL	100% chicken (S+B) 133°C	—	18.43 ± 0.00
S43	CCL	<b>0.1% bovine</b> (C+M) 133°C in pig feed	37.82 ± 0.12	12.71 ± 0.05
S44	CCL	<b>1% bovine</b> (C+M) 133°C in pig feed	29.75 ± 0.11	12.96 ± 0.02

TABLE 2. *Continued*

Code <sup>a</sup>	Origin <sup>b</sup>	Sample description <sup>c</sup>	Real-time PCR results ( <i>C<sub>p</sub></i> ) <sup>d</sup>	
			RSS	PAC
S45	CCL	100% porcine protein	—	24.11 ± 0.01
S46	CCL	100% pork soft tissue 133°C	—	17.64 ± 0.07
S47	CCL	100% pork soft tissue 159°C	—	22.84 ± 0.04
S48	CCL	100% pork bones 159°C	—	25.60 ± 0.02
S49	CCL	5% pork (S+B) in chicken (S+B) 133°C	—	18.23 ± 0.01
S50	CCL	2% pork (S+B) in chicken (S+B) 133°C	—	18.50 ± 0.03
S51	CCL	0.5% pork (S+B) in chicken (S+B) 133°C	—	18.24 ± 0.00
S52	CCL	100% porcine carcass 133°C	—	26.65 ± 0.04
S53	CCL	<b>100% ovine</b> carcass 133°C	23.08 ± 0.06	22.49 ± 0.07
S54	CCL	<b>1% ovine</b> (C+M) 133°C in pig feed	32.41 ± 0.04	12.81 ± 0.06
S55	CCL	<b>0.1% ovine</b> (C+M) 133°C in pig feed	37.10 ± 0.15	12.02 ± 0.01
S56	CCL	1% pork (S+B) in chicken (S+B) 133°C	—	17.82 ± 0.02
S57	CCL	0.1% pork (S+B) in chicken (S+B) 133°C	—	18.07 ± 0.02
S58	CCL	0.2% pork (S+B) in chicken (S+B) 133°C	—	17.87 ± 0.01
S59	CCL	100% pork soft tissue 133°C	—	20.57 ± 0.00
S60	CCL	100% pork soft tissue 159°C	—	26.14 ± 0.08
S61	CCL	100% pork soft tissue, defatted 133°C	—	24.01 ± 0.03
S62	CCL	100% pork soft tissue, defatted 159°C	—	32.28 ± 0.05
S63	CCL	100% pork bones 133°C	—	15.81 ± 0.06
S64	CCL	100% pork bones 159°C	—	26.19 ± 0.53
S65	CCL	100% pork bones 133°C	—	19.64 ± 0.03
S66	CCL	100% pork bones, defatted 133°C	—	28.77 ± 0.01
S67	CCL	100% pork bones, defatted 159°C	—	21.13 ± 0.16
S68	CCL	100% chicken soft tissue 133°C	—	21.18 ± 0.01
S69	CCL	100% porcine carcass 137°C	—	26.07 ± 0.01
S70	CCL	100% porcine carcass 141°C	—	27.95 ± 0.05
S71	CCL	100% porcine carcass 145°C	—	29.59 ± 0.03
S72	CCL	100% porcine muscle 133°C	—	27.45 ± 0.04
S73	CCL	100% porcine muscle 137°C	—	25.00 ± 0.08
S74	CCL	100% porcine muscle 141°C	—	27.56 ± 0.02
S75	CCL	100% porcine muscle 145°C	—	29.04 ± 0.01
S76	CCL	<b>1% bovine</b> carcass 141°C in porcine carcass 137°C	33.32 ± 0.08	26.04 ± 0.03
S77	CCL	<b>2% bovine</b> carcass 141°C in porcine carcass 137°C	32.43 ± 0.08	26.03 ± 0.07
S78	CCL	<b>1% bovine</b> carcass 145°C in porcine carcass 137°C	34.83 ± 0.03	26.22 ± 0.00
S79	CCL	<b>2% bovine</b> carcass 145°C in porcine carcass 137°C	33.11 ± 0.04	25.73 ± 0.04
S80	CCL	<b>1% bovine</b> (C+M) 133°C in pork (S+B) 133°C	29.20 ± 0.02	17.77 ± 0.09
S81	CCL	<b>1% bovine</b> muscle 145°C in porcine PAP	35.30 ± 0.20	27.58 ± 0.02
S82	CCL	100% avian carcass 137°C	—	22.66 ± 0.01
S83	CCL	<b>0.5% RRI</b> 133°C in aquafeed	27.99 ± 0.02	13.02 ± 0.02
S84	CCL	<b>0.1% bovine</b> (C+M) 133°C in chicken (S+B) 133°C	34.27 ± 0.02	18.41 ± 0.07
S85	CCL	<b>0.2% bovine</b> (C+M) 133°C in chicken feed	32.41 ± 0.08	12.78 ± 0.06
S86	CCL	<b>0.5% bovine</b> (C+M) 133°C in pig feed + 5% chicken PAP	31.57 ± 0.03	13.77 ± 0.02
S87	CCL	100% hydrolyzed feather meal	—	27.69 ± 0.07
S88	CCL	100% porcine muscle 137°C	—	25.18 ± 0.06
S89	CCL	<b>0.1% bovine</b> (C+M) 133°C in poultry meal	34.38 ± 0.04	17.65 ± 0.07
S90	CCL	<b>1% bovine</b> muscle 141°C in porcine carcass 133°C	32.35 ± 0.05	24.77 ± 0.02
S91	CCL	<b>1% bovine</b> (C+M) 133°C in feed + 5% porcine PAP	28.40 ± 0.05	13.23 ± 0.03
S92	CCL	<b>0.5% bovine</b> carcass 137°C in porcine PAP	34.64 ± 0.06	24.65 ± 0.08
S93	CCL	<b>0.2% bovine</b> (C+M) 133°C in pig feed	33.42 ± 0.03	12.97 ± 0.03
S94	CCL	<b>1% bovine</b> (C+M) 133°C in pork greaves meal	29.22 ± 0.01	17.61 ± 0.00
S95	CCL	<b>2% bovine</b> (C+M) 133°C in pork greaves meal	28.57 ± 0.02	18.36 ± 0.04
S96	CCL	<b>0.1% ovine</b> carcass 133°C in feather meal	35.96 ± 0.07	24.84 ± 0.07
S97	CCL	100% feather meal	—	27.89 ± 0.03
S98	CCL	100% avian carcass 133°C	—	22.66 ± 0.03
S99	CCL	100% chicken bones 133°C	—	17.97 ± 0.06
S100	CCL	2% avian carcass 133°C in porcine protein	—	24.07 ± 0.05
S101	CCL	1% avian carcass 133°C in porcine protein	—	26.00 ± 0.03
S102	CCL	0.5% avian carcass 133°C in porcine protein	—	25.23 ± 0.09



TABLE 2. Continued

Code <sup>a</sup>	Origin <sup>b</sup>	Sample description <sup>c</sup>	Real-time PCR results (Cp) <sup>d</sup>	
			RSS	PAC
S103	CCL	0.1% avian carcass 133°C in porcine protein	—	24.98 ± 0.00
S104	CCL	2% chicken bones 133°C in porcine protein	—	26.68 ± 0.07
S105	CCL	1% chicken bones 133°C in porcine protein	—	26.04 ± 0.02
S106	CCL	0.5% chicken bones 133°C in porcine protein	—	25.01 ± 0.06
S107	CCL	0.1% chicken bones 133°C in porcine protein	—	20.11 ± 0.09
S108	CCL	100% chicken (S+B) 133°C	—	19.27 ± 0.03
S109	CCL	5% chicken (S+B) 133°C in pork (S+B) 133°C	—	20.66 ± 0.09
S110	CCL	2% chicken (S+B) 133°C in pork (S+B) 133°C	—	20.78 ± 0.02
S111	CCL	100% pig feed	—	13.07 ± 0.08
S112	CCL	1% chicken (S+B) 133°C in pig feed	—	13.25 ± 0.08
S113	CCL	5% chicken (S+B) 133°C in pig feed	—	14.00 ± 0.01
S114	CCL	1% avian muscle 145°C in porcine protein	—	28.10 ± 0.05
S115	CCL	100% hydrolyzed feather meal	—	27.61 ± 0.07
S116	CCL	<b>100% ovine</b> carcass 133°C	23.15 ± 0.01	20.04 ± 0.03
S117	CCL	<b>5% bovine</b> (C+M) 133°C in pig feed	28.74 ± 0.02	12.13 ± 0.00
S118	CCL	1% avian muscle 141°C in porcine carcass 133°C	—	25.07 ± 0.01
S119	CCL	1% avian carcass 133°C in porcine protein	—	26.04 ± 0.01

<sup>a</sup> Reference samples are coded with R (ruminant) or C (caprine).

<sup>b</sup> CCL, Cooperative Central Laboratory (CCL-Nutricontrol, The Netherlands); NBTA, Department of Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos (Spain); CRAW, Centre Wallon de Recherches Agronomiques (CRA-W, Belgium).

<sup>c</sup> Bold percentages correspond to samples containing declared target material. RR1, ruminant PAP consisting of 60% bovine carcass, 20% ovine carcass, 15% bovine muscle, and 5% ovine muscle. S+B, soft tissue plus bones; C+M, carcass plus muscle; PAP, processed animal protein; MBM, meat and bone meal.

<sup>d</sup> Mean ± standard deviation Cp values of triplicate reactions from each DNA extraction. Minus sign indicates no positive signal after 50 PCR cycles.

samples were extracted from each feed sample. A negative control sample was included with every DNA extraction.

**Primer and probe design.** Mitochondrial 16S rRNA gene sequences from various animal species available in the National Center for Biotechnology Information database were aligned with the EMMA program included in the EMBOS software package version 2.0 (<http://embosgui.sourceforge.net/demo/manual/emma.html>). Sequences were *Bos taurus* FJ971088, *Ovis aries* NC\_001941, *Capra hircus* NC\_005044, *Sus scrofa* GQ351599, *Equus caballus* NC\_001640, *Oryctolagus cuniculus* NC\_001913, and *Gallus gallus* X52392. After sequence comparison and analysis, a ruminant-specific primer pair was designed for the selective amplification of a 79-bp DNA fragment common to the three aligned ruminant species: cow, sheep, and goat. The primers were *RUM16SDIR* (5'-TGTTGTCCAGAAGATG-3') and *RUM16SINV* (5'-ACTTTTAAARMTACAGTGRRATTTATTT-3'). A TaqMan probe, *RUM16SP* (5'-6FAM-AGTTCAGCTTTAAARA+T+A+C+C+AA-BBQ-3') was designed to anneal within the gene fragment generated by amplification of the corresponding ruminant target. A piece of the ruminant-specific PCR system, a conserved eukaryotic 77-bp fragment of the 18S rRNA gene, flanked by *18SDIR* (5'-TGTTGCCAGCAGCCGC-3') and *18SINV* (5'-TCCAACCTACGAGCTTTTAACTGCA-3') primers was used as a positive amplification control for the assay. The conserved TaqMan probe *18SP* (5'-6FAM-CGCTATTGGA+G+CT+G+GAATTACC-BBQ-3') was designed internal to the 18S rRNA primers. Symbols (+) along the oligonucleotide sequences denote locked nucleic acid bases needed for optimal probe hybridization. Primer Express 2.0 software (Perkin-Elmer, Applied Biosystems Division, Foster City, CA) was used to help with primer design. TaqMan probes were designed and synthesized by TibMolBiol (Berlin, Germany).

**Real-time PCR setup.** The real-time PCR assay was run under generic cycling conditions. The optimum PCR concentrations of primers yielding the highest endpoint fluorescence and the lowest crossing point (Cp) values were 300 and 900 nM for forward and reverse primers, respectively. The PCRs were carried out using the LightCycler TaqMan Master (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany), 2 pmol of each TaqMan probe (TibMolBiol), and 100 ng of DNA. Amplification reactions were performed in a total reaction volume of 10 µl in a glass capillary tube and were run on the LightCycler 2.0 Instrument (Roche Applied Science, Penzberg, Germany) with a program of 10 min at 95°C and then amplification with 50 cycles at 95°C for 10 s, 55°C for 30 s, and 72°C for 1 s. Samples were finally cooled to 40°C for 30 s. This program was used to amplify the ruminant-specific system with the positive amplification control.

The Cp value, which is the cycle number where the sample's fluorescence significantly increases above the background level, was calculated automatically by the LightCycler software as the first maximum of the second derivative of the curve.

**Construction of the standard curve and data analysis.** A standard curve was constructed and statistically analyzed to determine the correlation between the Cp values obtained in the real-time PCR and the concentration of ruminant DNA in feed. For this purpose, five ruminant reference samples (R1 through R5) containing increasing known amounts of target material and rendered under homogeneous conditions (Table 2) were used. The correlation between the variables, Cp, and concentration (in brackets) is semilogarithmic:

$$Cp = b \log[\text{concentration}] + a$$

where *b* is the slope and *a* is the intercept.

Linearity, sensitivity, accuracy, and precision parameters of the reference real-time PCR system were evaluated according to previously described methods (5, 19). To test the validity of the assay, three separate DNA extractions from samples with different percentages of ruminant material were assayed on different days, with three replicates of each extraction. Precision of the assay was evaluated by comparing the coefficients of variation (CVs) obtained on three different days versus that obtained on the same day to assess the influence of random events (day of analysis, analyst, equipment, etc.) on the data obtained from the feed samples.

## RESULTS AND DISCUSSION

**TaqMan real-time PCR.** A total ban on the use of PAPs, including MBM, in feed for any farmed animal (11) has been in effect since 2001. Currently, European regulators are evaluating a partial lifting of the total ban by prohibiting only ruminant PAPs, but a suitable analytical method must be available to identify the species of origin of all materials in the feed. To meet this demand, various real-time PCR assays for detection of species of origin of materials in feedstuffs have been reported over the last few years (7, 15, 16, 24, 25). In the present study, a TaqMan real-time PCR assay for detection of ruminant material in animal feeds was developed and evaluated. The assay involves two primer-probe systems: a 16S rRNA system specific for ruminant DNA and a consensus 18S rRNA system for total eukaryotic DNA (as a positive amplification control [PAC]).

The mitochondrial 16S rRNA gene was selected as a ruminant-specific marker because it has low intraspecies and high interspecies nucleotide variation and is present in multiple copies in the cells, increasing the specificity and sensitivity of this PCR assay for analysis of highly processed matrices (9, 10). The sterilization conditions specified by the EU for the feed manufacturing process (minimum temperatures of 133°C at a pressure of 3 bars or higher for 20 min) require optimization of PCR assays, mostly relying on the selection of amplicons of very short length (13). However, the shorter the fragment lengths, the more difficult it may be to design primers and probes that provide reasonable specificity in a system for detecting a group of animals such as ruminants (4). In spite of this restraint, the mitochondrial 16S rRNA gene sequences targeted in this work allowed optimal design of a short PCR system (79 bp), potentially sensitive and specific enough to identify material of ruminant origin.

**Specificity and sensitivity.** After preliminary conventional PCR assays were conducted to corroborate the amplification of the predicted ruminant-specific and eukaryotic DNA fragments (results not shown), the specificity of the ruminant real-time PCR system was evaluated by testing DNA from tissues of 45 species (mammals, fish, birds, and plants) to determine the risk of false-negative results. The assay detected the expected specific DNA fragment of 79 bp from all tested ruminant tissues (domestic bovine, ovine, and caprine species and wild ruminants), but no positive amplification signal was generated for the nontarget species tested (Table 1). The 18S rRNA PAC

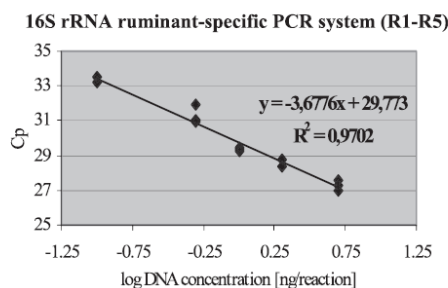
system amplified a 77-bp fragment from all eukaryotic species analyzed.

Sensitivity (true positive results) and selectivity (true negative results) are important indices of performance of real-time PCR analysis used to detect the presence of banned PAPs in feeds (31). To assess the sensitivity of the ruminant-specific real-time PCR system, initial analyses were done with five reference feeds (R1 through R5) containing 0.1, 0.5, 1, 2, and 5% ruminant (bovine plus ovine) PAPs and with two experimentally prepared samples (C1 and C2) containing 0.1 and 1% caprine material. The ruminant material was successfully detected in the seven reference samples, even at the lowest concentration (0.1%) (Table 2). To further evaluate the applicability of the developed PCR assay for routine analysis of commercial animal feeds, extensive testing was performed with a batch of 119 blind industrial feeds manufactured at temperatures ranging from 133 to 159°C. Results of these assays were compared with data provided by European laboratories, including composition and treatment of the samples. Results reported herein show a total qualitative agreement between the declared ruminant content and the positive *C<sub>p</sub>* values obtained with the TaqMan real-time PCR developed. With this assay, 41.2% (49) of the 119 blind samples analyzed were positive for ruminant material (*C<sub>p</sub>* values from 23.08 ± 0.06 to 39.37 ± 0.10); amplification signals were obtained even for those samples treated at 145°C (samples S78, S79, and S81) (Table 2).

All true positive ruminant samples contained different levels of bovine and/or ovine MBM. However, no caprine by-products were detected in any of the blind industrial feed samples, because such materials were not available from the European laboratories that supplied the samples. Most of the few published studies reporting PCR detection of ruminant-derived material in feedstuffs have included analysis of MBM rendered from bovine and/or ovine species (9, 10, 21, 22, 27, 28), and only a limited number of studies have included caprine materials in their sampling analysis (1, 2, 17). In the present study, 0.1 and 1% caprine reference samples (C1 and C2) were successfully detected with the ruminant PCR system. However, because these samples had been subjected to a laboratory-scale autoclaving process that is not comparable to the EU-approved processes used for animal meals, samples representative of the real-world feed ingredients containing caprine PAPs should be assayed to assess the performance of this PCR method for the detection of caprine materials in feedstuffs. In agreement with the composition data, no PCR signal was generated for any of the blind samples that had been declared free from ruminant content (58.8% of the 119 samples), meeting the desired selectivity requirements. The positive signals obtained with the PAC for all the industrial feed samples are indicative of the presence of amplifiable eukaryotic DNA.

**Calibration curve and statistical analysis.** To assess the quantitative potential of the real-time PCR assay, results for the ruminant reference feed samples (R1 through R5) were used to construct a calibration curve based on a simple regression model with the log input DNA concentration

FIGURE 1.  $C_p$  values obtained from 16S rRNA ruminant reference samples, plotted versus the logarithm of the DNA concentrations. Linearity test, regression line, and sensitivity parameters were calculated for the ruminant-specific PCR system.



Total number of samples	15
"C" Cochran	0.6838*
S <sup>2</sup> comb	0.099
ANOVA test "F" regression (1)	423.63**
ANOVA test "F" Lack-of-Fit (2)	3.56***
Discriminating capacity	0.075*

\*  $p < 0.05$  \*\*  $p < 0.01$

\*\*\*  $p > 0.05$

(1) P value = 0.000

(2) P value = 0.05

versus the  $C_p$  (Fig. 1). The slope of the log input DNA amount versus the  $\Delta C_p$  was  $-3.68$ , near to the  $-3.32$  corresponding to 100% PCR efficiency. The theoretical detection limit of the ruminant PCR system also was calculated from the standard curve. The detection limit was estimated as the DNA amount yielding a  $C_p$  value of 50. The detection limit was  $3.16 \times 10^{-6}$  ng.

$C_p$  values obtained from the calibration curve were plotted against the logarithm of the DNA concentrations and used to test the sensitivity of the real-time PCR method. Figure 1 shows the discriminating capacity, which is the least difference in the logarithm of the target DNA concentration in the sample that the analytical method can discriminate at the specified significance level. Linearity of the ruminant real-time PCR response also was analyzed. In the PCR system, the following tests were used: (i) Cochran's test, which determined whether the variances of the responses obtained for each concentration of ruminant DNA in the reference feeds were homogeneous, (ii) regression analysis, and (iii) variance analysis with lack of fit. The results are summarized in Figure 1.

The accuracy of the ruminant PCR assay was determined based on results for the samples spiked with the five ruminant MBM percentages (0.1 to 5%). Accuracy was reported as the percent recovery by the assay of known added amounts of analyte. The Snedecor  $F$  test was used to verify that the concentration of DNA present in a sample did not affect the results. The values for Student's  $t$  test revealed that the method was accurate; no significant differences between 100% and the mean recovery values were detected. The influence of day of analysis on the precision of the assay also was tested by comparing the CVs of three separate DNA extractions performed on the 0.1% ruminant PAPs that were analyzed in triplicate either three times on the same day or on three different days. Results showed significant differences with higher CVs when the assay was done on different days with respect to assays done on the same day. Thus, a standard curve should be determined on each day of analysis.

**Analysis of industrial feeds.** The results obtained indicate the ability of the ruminant-specific real-time PCR system to deliver accurate qualitative results for detection of ruminant PAP in feeds. Analysis of the standard curve revealed a positive correlation between fluorescence values

and the concentration of ruminant DNA, which suggests that the assay may be useful for obtaining quantitative information about a sample. However, results obtained after testing the 119 blind industrial feeds reflected complete lack of consistency, especially for those samples containing the same amount of target. For example, industrial feed samples containing 0.1% bovine MBM (S2, S12, S20, S27, S39, S43, S84, and S89) produced variable  $C_p$  values ranging from  $29.61 \pm 0.08$  to  $37.82 \pm 0.12$ . A similar heterogeneous tendency was observed in the  $C_p$  values for industrial feed samples containing ovine material. Therefore, it was not possible to establish a quantitative correlation between the fluorescence value obtained in an unknown (blind) sample and the amount of target contained in the sample.

Various factors may explain this lack of consistency. The species origin in the reference ruminant matrix RR1 (containing bovine plus ovine MBM) differed from those in the blind feed samples (containing mostly either ovine or bovine material), making extrapolation of blind sample  $C_p$  results difficult. Another important problem associated with obtaining quantitative results from real-time PCR assay of feeds is the heterogeneous nature of the vegetal and animal ingredients that can be present in compounded feeds, including the different kind of MBMs (e.g., bone, muscle, blood, and connective tissue). Quantitative results may have been influenced by the variable number of cells, and consequently variation in the amount of amplifiable DNA, depending on the tissue (6, 25). The most limiting factor for quantitative real-time PCR assays is the different processing conditions to which the feeds are subjected, which affect the amount and quality of amplifiable DNA. The higher the treatment temperature of the feed, the higher the  $C_p$  value obtained with the PCR assay will be for the same amount of target (4). Regardless of other influencing factors such as tissue matrix type, fluorescent values of feeds containing declared levels of ruminant material and subjected to processing temperatures of 133°C were in general lower than those of feeds of equivalent ruminant material concentration but processed at higher temperatures (141 to 145°C) (Table 2). As a consequence, blind feed A containing a somewhat higher amount of banned animal material could be easily misidentified in a blind trial as feed B containing a lower amount of target, as long as feed A is processed at a higher temperature than feed B. This



confusion could be problematic if the European Food Safety Authority were to decide to adopt certain tolerance levels for the presence of small quantities of MBM in animal feed as a result of accidental cross-contamination along the feed processing chain.

Thus, the  $C_p$  value measured for a blind feedstuff sample would be useable for a quantitative estimate of the target species material only if identical MBMs and feed matrices in relation to composition and processing treatment were available for the preparation of suitable calibration standards, a condition that clearly is not possible to meet from a practical point of view. These observations agree with results obtained by other authors (15, 23, 25, 30) with respect to the limitations of real-time PCR assays for quantification of materials from various species of origin in feed. An important achievement of the present study was that the applicability of this real-time PCR assay for detection of ruminant-derived material was corroborated through the analysis of a wide range of industrial feed samples that represent a realistic sampling of commercially available feeds. In contrast, most published works on this matter (10, 17, 21, 22) generally have incorporated MBMs experimentally prepared at the laboratory, and only a few studies have included a suitable but limited representation of commercial feed samples. Few published works have focused on PCR detection of ruminant materials in feeds compared with a large number of studies in which PCR assays were used for detection of material from a single species, usually bovine MBM (13, 20, 25). The majority of studies conducted on detection of ruminant material in feeds have been performed with conventional PCR methods, which have important disadvantages compared with real-time PCR assays, such as lower sensitivity, longer testing times, higher contamination rates, and the need for postamplification processing (32).

The ruminant-specific real-time PCR system reported herein is a rapid and sensitive analytical technique that can be used as a complement to other methods applied in the EU to accurately detect banned ruminant-derived materials in animal feedstuffs. The samples analyzed in the present study were representative of real-world products of feed rendering processes, demonstrating the practical value of this real-time PCR approach for use as a rapid screening method.

#### ACKNOWLEDGMENTS

The authors are indebted to CCL-Nutricontrol and CRA-W for kindly providing us with the industrial feed samples analyzed in this study. This work was supported by the Programa de Vigilancia Sanitaria 2009/AGR/1489 of the Comunidad de Madrid (Spain). N. Pegels is recipient of a fellowship from the Ministerio de Ciencia e Innovación (Spain).

#### REFERENCES

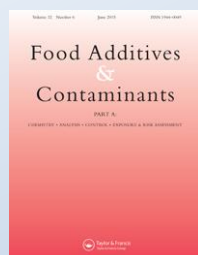
- Bellagamba, F., S. Comincini, L. Ferretti, F. Valfrè, and V. M. Moretti. 2006. Application of quantitative real-time PCR in the detection of prion-protein gene species-specific DNA sequences in animal meals and feedstuffs. *J. Food Prot.* 69:891–896.
- Bellagamba, F., F. Valfrè, S. Panseri, and V. M. Moretti. 2003. Polymerase chain reaction-based analysis to detect terrestrial animal protein in fish meal. *J. Food Prot.* 66:682–685.
- Berger, R. G., R. P. Mageau, B. Schwab, and R. W. Johnson. 1988. Detection of poultry and pork in cooked and canned meat foods by enzyme-linked immunosorbent assays. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 71:406–409.
- Brodmann, P. D., and D. Moor. 2003. Sensitive and semi-quantitative TaqMan™ real-time polymerase chain reaction systems for the detection of beef (*Bos taurus*) and the detection of the family Mammalia in food and feed. *Meat Sci.* 65:599–607.
- Camacho, M. A., A. I. Torres, M. E. Gil-Alegre, M. M. Obregón, and V. Ruz. 1993. Validation protocol of analytical methods for finished pharmaceutical products. *STP Pharma Pratiques* 3:97–202.
- Cankar, K., D. Štebih, T. Dreo, J. Žel, and K. Gruden. 2006. Critical points of DNA quantification by real-time PCR—effects of DNA extraction method and sample matrix on quantification of genetically modified organisms. *BMC Biotechnol.* 6:37.
- Cawthraw, S., G. C. Saunders, T. C. Martin, J. Sawyer, O. Windl, and S. D. Readney. 2009. Real-time PCR detection and identification of prohibited mammalian and avian material in animal feeds. *J. Food Prot.* 72:1055–1062.
- Chen, F. C., and Y. H. Hsieh. 2000. Detection of pork in heat-processed meat products by monoclonal antibody-based ELISA. *J. AOAC Int.* 83:79–85.
- Chiappini, B., G. Brambilla, U. Agrimi, and G. Vaccari. 2005. Real-time polymerase chain reaction approach for quantitation of ruminant-specific DNA to indicate a correlation between DNA amount and meat and bone meal heat treatments. *J. AOAC Int.* 88:1399–1403.
- Dalmasso, A., E. Fontanella, P. Piatti, T. Civera, S. Rosati, and M. T. Bottero. 2004. A multiplex PCR assay for the identification of animal species in feedstuffs. *Mol. Cell. Probes* 18:81–87.
- European Commission. 2006. Regulation (EC) No 1923/2006 of the European Parliament and of the Council of 18 December 2006 amending Regulation (EC) No 999/2001 laying down rules for the prevention, control and eradication of certain transmissible spongiform encephalopathies. *Off. J. Eur. Union L* 404:1–8.
- European Commission. 2009. Commission Regulation (EC) No 152/2009 of 27 January 2009 laying down the methods of sampling and analysis for the official control of feed. *Off. J. Eur. Union L* 54:1–130.
- Frezza, D., M. Favaro, G. Vaccari, C. von Holst, V. Giambra, E. Anklam, D. Bove, P. A. Battaglia, U. Agrimi, G. Brambilla, P. Ajmone-Marsan, and M. Tartaglia. 2003. A competitive polymerase chain reaction-based approach for the identification and semiquantification of mitochondrial DNA in differently heat-treated bovine meat and bone meal. *J. Food Prot.* 66:103–109.
- Frezza, D., V. Giambra, F. Chegiani, C. Fontana, G. Maccabiani, N. Losio, E. Faggionato, B. Chiappini, G. Vaccari, C. von Holst, L. Lanni, S. Saccares, and P. Ajmone-Marsan. 2008. Standard and light-cycler PCR methods for animal DNA species detection in animal feedstuffs. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 9:18–23.
- Fumière, O., M. Dubois, V. Baeten, C. von Holst, and G. Berben. 2006. Effective PCR detection of animal species in highly processed animal byproducts and compound feeds. *Anal. Bioanal. Chem.* 385:1045–1055.
- Fumière, O., A. Marien, J. A. Fernández Pierna, V. Baeten, and G. Berben. 2010. Development of a real-time PCR protocol for the species origin confirmation of isolated animal particles detected by NIRM. *Food Addit. Contam.* 27:1118–1127.
- Ha, J. C., W. T. Jung, Y. S. Nam, and T. W. Moon. 2006. PCR identification of ruminant tissue in raw and heat-treated meat meals. *J. Food Prot.* 69:2241–2247.
- Huby-Chilton, F., J. Murphy, N. B. Chilton, A. A. Gajadhar, and B. W. Blais. 2010. Detection of prohibited animal products in livestock feeds by single-strand conformation polymorphism analysis. *J. Food Prot.* 73:119–124.
- International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. 2005. Harmonised tripartite guideline. Validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1). Available at: [http://www.ich.org/fileadmin/Public\\_Web\\_Site/ICH\\_Products/Guidelines/Quality/Q2\\_R1/Step4/Q2\\_R1\\_Guideline.pdf](http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1_Guideline.pdf). Accessed May 2011.
- Krcmár, P., and E. Rencová. 2001. Identification of bovine-specific DNA in feedstuffs. *J. Food Prot.* 64:117–119.

21. Kusama, T., T. Nomura, and K. Kadowaki. 2004. Development of primers for detection of meat and bone meal in ruminant feed and identification of the animal of origin. *J. Food Prot.* 67:1289–1292.
22. Mendoza-Romero, L., E. L. C. Verkaar, P. H. Savelkoul, A. Catsburg, H. J. M. Aarts, J. B. Buntjer, and J. A. Lenstra. 2004. Real-time PCR detection of ruminant DNA. *J. Food Prot.* 67:550–554.
23. Myers, M. J., D. E. Farrell, C. M. Deaver, J. Mason, H. L. Swaim, and H. F. Yancy. 2010. Detection of rendered meat and bone meals by PCR is dependent on animal species of origin and DNA extraction method. *J. Food Prot.* 73:1090–1096.
24. Prado, M., G. Berben, O. Fumière, G. van Duijn, J. Mensinga-Kruize, S. Reaney, A. Boix, and C. von Holst. 2007. Detection of ruminant meat and bone meals in animal feed by real-time polymerase chain reaction: result of an interlaboratory study. *J. Agric. Food Chem.* 55:7495–7501.
25. Prado, M., O. Fumière, A. Boix, A. Marien, G. Berben, and C. von Holst. 2009. Novel approach for interlaboratory transfer of real-time PCR methods: detecting bovine meat and bone meal in feed. *Anal. Bioanal. Chem.* 394:1423–1431.
26. Rojas, M., I. González, V. Fajardo, I. Martín, P. E. Hernández, T. García, and R. Martín. 2008. Polymerase chain reaction–restriction fragment length polymorphism authentication of raw meats from game birds. *J. AOAC Int.* 91:1416–1422.
27. Shinoda, N., T. Kusama, T. Yoshida, T. Sugiura, K. Kadowaki, T. Onodera, and K. Sugiura. 2008. Developing PCR primers using a new computer program for detection of multiple animal-derived materials in feed. *J. Food Prot.* 71:2257–2262.
28. Tajima, K., E. Osamu, M. Amari, M. Mitsumori, H. Kajikawa, M. Kurihara, S. Yanai, H. Matsui, H. Yasue, T. Mitsuhashi, T. Kawashima, and M. Matsumoto. 2002. PCR detection of DNAs of animal origin in feed by primers based on sequences of short and long interspersed repetitive elements. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 66:2247–2250.
29. Van Raamsdonk, L. W. D., C. von Holst, V. Baeten, G. Berben, A. Boix, and J. de Jong. 2007. New developments in the detection and identification of processed animal proteins in feeds. *Anim. Feed Sci. Technol.* 133:63–83.
30. Woodgate, S. L., S. van den Hoven, J. Vaessen, and R. Margry. 2009. Control tools to detect processed animal proteins in feed and in animal by-products: specificity and challenges. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 13:9–13.
31. Yancy, H. F., J. D. Washington, L. Callahan, J. A. Mason, C. M. Deaver, D. E. Farrell, T. Ha, E. Sespico, D. Falmlen, and M. J. Myers. 2009. Development, evaluation, and peer verification of a rapid real-time PCR method for the detection of animal material. *J. Food Prot.* 72:2368–2374.
32. Zhang, C.-L., M. R. Fowler, N. W. Scott, G. Lawson, and A. Slater. 2007. A TaqMan real-time PCR system for the identification and quantification of bovine DNA in meats, milks and cheeses. *Food Control* 18:1149–1158.



### III.1.2. MONOGASTRICS

**Sensitive detection of porcine DNA in processed animal proteins using a TaqMan real-time PCR assay.**



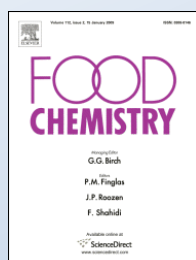
**Food Additives and Contaminants**  
*Volume 29, pages 1402-1412, 2012*

**Evaluation of a TaqMan real-time PCR assay for detection of chicken, turkey, duck, and goose material in highly processed industrial feed samples.**



**Poultry Science**  
*Volume 91, pages 1709-1719, 2012*

**Avian-specific real-time PCR assay for authenticity control in farm animal feeds and pet foods.**



**Food Chemistry**  
*Volume 142, pages 39-47, 2014*



### Sensitive detection of porcine DNA in processed animal proteins using a TaqMan real-time PCR assay

N. Pegels, I. González\*, S. Fernández, T. García and R. Martín

*Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, E-28040 Madrid, Spain*

(Received 16 December 2011; final version received 20 May 2012)

A TaqMan real-time PCR method was developed for specific detection of porcine-prohibited material in industrial feeds. The assay combines the use of a porcine-specific primer pair, which amplifies a 79 bp fragment of the mitochondrial (mt) 12S rRNA gene, and a locked nucleic acid (LNA) TaqMan probe complementary to a target sequence lying between the porcine-specific primers. The nuclear 18S rRNA gene system, yielding a 77 bp amplicon, was employed as a positive amplification control to monitor the total content of amplifiable DNA in the samples. The specificity of the porcine primers-probe system was verified against different animal and plant species, including mammals, birds and fish. The applicability of the real-time PCR protocol to detect the presence of porcine mt DNA in feeds was determined through the analysis of 190 industrial feeds (19 known reference and 171 blind samples) subjected to stringent processing treatments. The performance of the method allows qualitative and highly sensitive detection of short fragments from porcine DNA in all the industrial feeds declared to contain porcine material. Although the method has quantitative potential, the real quantitative capability of the assay is limited by the existing variability in terms of composition and processing conditions of the feeds, which affect the amount and quality of amplifiable DNA.

**Keywords:** TaqMan real-time PCR; 12S rRNA gene; porcine; processed animal proteins; industrial feeds

#### Introduction

Current evidence shows that bovine spongiform encephalopathy (BSE) originated from supplementary feed containing meat and bone meal (MBM) contaminated with a scrapie-like agent derived from sheep or cattle (Hahn 1999). Because of this likely route of infection, feed bans have been enforced in the European Union, initially on the inclusion of ruminant-processed animal proteins (PAPs) in feeds for ruminants and, later, on the use of processed protein from any animal species in feeds for all farmed animals, with certain limited exceptions (European Commission 2003). Moreover, Regulation 2009/1069/EC introduced the principle that material derived from animals is not to be fed to animals of the species from which it is derived (intra-species recycling ban) (European Commission 2009a). Nevertheless, such prohibition will only take effect when non-ruminant PAP (i.e. pig and poultry) is once again authorised in feed for farmed animals other than ruminants (Gizzi et al. 2003). Therefore, to ensure the proper accomplishment of the legislation in force, sensitive and reliable analytical techniques that can discriminate PAPs at species level are necessary (EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ) 2011).

Classical microscopy remains until now the only method officially accepted for detection of ingredients of animal origin by the European Union (European Commission 2009b). The major strengths of the microscopic detection method are: sufficient detection at contamination levels of 0.1%, the indication of the type of detected materials (mainly bone fragments and muscle fibres), and the insensibility for the sterilisation temperatures applied during feed processing (BIOHAZ 2011; van Raamsdonk et al. 2011). Conversely, microscopy does not allow a determination of the species origin of the feed material and is time consuming and labour intensive (Gizzi et al. 2003). In the last few years, alternative analytical methods have been proposed, as such or in combination, to test for the presence of animal PAP in feedstuffs and gain precise information on feed species composition. Biomolecular techniques based on the analysis of either protein or DNA contents offer undoubted advantages, such as having a high degree of specificity and being applicable to heat-processed products (Bottero et al. 2003). However, in the particular framework of PAP detection in feedstuffs, successful application of these methods may be hampered by the molecular degradation occurred during the rendering process applied to

\*Corresponding author. Email: gonzalzi@vet.ucm.es

the feed (Momcilovic and Rasooly 2000). In comparison with proteins, DNA is much more stable against technological treatments and can be detected in small amounts in processed food and feed, independently of the tissue source (Götherström et al. 2002). Among DNA-based approaches, the amplification of specific DNA sequences by means of the polymerase chain reaction (PCR) is presently the most popular and renowned DNA-based method for species assignment in feeds (Fumière et al. 2009).

A number of published works have reported the advantages of using real-time PCR compared with conventional PCR for species identification in highly degraded matrices, like rendered animal tissues (Bellagamba et al. 2006; Fumière et al. 2006; Cawthraw et al. 2009; Prado et al. 2009; Yancy et al. 2009). These include, for example: (1) the ability to detect very small size products, since it eliminates the need for gel visualisation; (2) the reduced risks for crossover contamination, as reactions are kept confined during amplification and analysis; and (3) the capability for large-scale processing and high automated throughput. TaqMan probe chemistry is among the most broadly applied real-time PCR technologies to detect banned animal material in feedstuffs. The main advantage of using the TaqMan real-time PCR platform for this purpose is the increased assay specificity, explained by the fact that detection is generated by the hydrolysis of an internal target-specific oligonucleotide (TaqMan probe) (Mendoza-Romero et al. 2004; Prado et al. 2007; Frezza et al. 2008; Gašparič et al. 2010).

We hereby report the development of a TaqMan real-time PCR method for the specific identification of porcine PAPs in feedstuffs, based on selective amplification of mitochondrial 12S rRNA gene sequences. The applicability of the assay was evaluated through screening analysis of a total of 190 industrial feed samples, consisting in a wide representation of animal tissues subjected to various severe heat-treatment conditions (from 133°C to 159°C).

## Materials and methods

### Sample selection and DNA extraction

Feed test materials used in the present study were manufactured and sent to the authors' laboratory by the Co-operative Central Laboratory "CCL-Nutricontrol" (Veghel, the Netherlands) and consisted of different PAPs, either pure or in a mixed-feed matrix. These industrial feeds were 19 reference samples containing increasing concentrations (from 0.1% to 100%) of varied porcine tissues, and a batch of 171 blind samples containing different types and concentrations of PAPs from porcine and non-porcine species. Feeds were produced under strict controlled

and recorded processing conditions. Porcine material was treated at 133, 137, 141, 145 or 159°C during 20 min at hyperbaric pressure.

A wide range of non-target animal and plant species was also included in the assays for specificity control purposes (Table 1).

Genomic DNA was obtained from 200 mg of each feed sample using the Wizard DNA Clean-up System® kit (Promega, Madison, WI, USA) as described by Pegels et al. (2011). The DNA was eluted in 100 µl of sterile deionised water and its concentration was measured with a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies Inc., Montchanin, DE, USA). Unless otherwise stated, three DNA replicates were extracted from each feed sample. A negative control sample was included in every DNA extraction.

### Oligonucleotide primers and probes

The oligonucleotides used in the real-time PCR assay were designed upon mt 12S rRNA and nuclear 18S rRNA gene sequences from various animal and plant species available in the NCBI (National Center for Biotechnology Information) database.

Alignment and computer analysis of mitochondrial 12S rRNA sequences allowed the design of porcine-specific primers (*P12SDIR/P12SINV*) for the amplification of a DNA fragment of 79 bp. Besides, a dual-labelled TaqMan® probe (*P12SP*) with a reporter fluorophore at the 5' end (6-carboxyfluorescein, FAM) and a quencher fluorophore at the 3' end (Blackberry, BBQ), was designed to anneal within the gene fragment generated by amplification of the corresponding target.

As a positive amplification control of real-time PCR experiments, a pair of universal primers (*18SDIR/18SINV*) and a TaqMan® probe (*18SP*) were designed on a conserved 18S rRNA gene fragment in all eukaryotic cells. This PCR system was expected to yield amplicons of the same length (approximately 77 bp) in all species analysed in this work.

The EMMA program included in the EMBOS software package version 2.0 and the Primer Express 2.0® software (Perkin-Elmer/Applied Biosystems Division, Foster City, CA, USA) were used for sequence alignment and primer design. TaqMan® probes were designed and synthesised by TibMolBiol (Berlin, Germany). The sequences and description of every primer and probe used in this study are listed in Table 2.

### Real-time PCR

Real-time PCR was run under generic cycling conditions. The optimum PCR concentrations of



Table 1. Specificity of the porcine real-time PCR system.

Common name	Scientific name	12S rRNA PSS	18S rRNA PAC
Swine	<i>Sus scrofa domestica</i>	13.83 ± 0.01 <sup>a</sup>	13.81 ± 0.00
Cattle	<i>Bos taurus</i>	—	16.99 ± 0.07
Sheep	<i>Ovis aries</i>	—	16.93 ± 0.01
Goat	<i>Capra hircus</i>	—	17.30 ± 0.02
Horse	<i>Equus caballus</i>	—	16.34 ± 0.05
Rabbit	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	—	14.05 ± 0.09
Cat	<i>Felis catus</i>	—	16.44 ± 0.04
Dog	<i>Canis familiaris</i>	—	15.15 ± 0.04
Rat	<i>Rattus norvegicus</i>	—	14.05 ± 0.06
Chicken	<i>Gallus gallus</i>	—	17.03 ± 0.02
Turkey	<i>Meleagris gallopavo</i>	—	14.28 ± 0.03
Duck	<i>Anas platyrhynchos</i> × <i>Cairina moschata</i>	—	15.92 ± 0.03
Goose	<i>Anser anser</i>	—	15.88 ± 0.01
Quail	<i>Coturnix coturnix</i>	—	16.95 ± 0.06
Pheasant	<i>Phasianus colchicus</i>	—	14.02 ± 0.03
Partridge	<i>Alectoris rufa</i>	—	16.26 ± 0.01
Guinea fowl	<i>Numida meleagris</i>	—	16.52 ± 0.07
Ostrich	<i>Struthio camelus</i>	—	16.41 ± 0.06
Red deer	<i>Cervus elaphus</i>	—	13.59 ± 0.03
Roe deer	<i>Capreolus capreolus</i>	—	14.16 ± 0.00
Fallow deer	<i>Dama dama</i>	—	13.45 ± 0.04
Sardine	<i>Sardina pilchardus</i>	—	16.10 ± 0.05
Tuna	<i>Thunnus atlanticus</i>	—	13.76 ± 0.02
Trout	<i>Salmo fario</i>	—	16.94 ± 0.09
Monk fish	<i>Lophius piscatorius</i>	—	14.70 ± 0.02
Red mullet	<i>Mullus barbatus</i>	—	14.63 ± 0.06
Nile perch	<i>Perca fluviatilis</i>	—	14.46 ± 0.04
Barley	<i>Hordeum vulgare</i>	—	12.98 ± 0.01
Maize	<i>Zea mays</i>	—	12.86 ± 0.01
Oat	<i>Avena sativa</i>	—	14.80 ± 0.08
Soybean	<i>Glycine max</i>	—	13.65 ± 0.01
Rye	<i>Secale cereale</i>	—	15.42 ± 0.02
Wheat	<i>Triticum aestivum</i>	—	14.99 ± 0.05
Sunflower	<i>Helianthus annuus</i>	—	13.65 ± 0.03
Rice	<i>Oryza sativa</i>	—	14.31 ± 0.05
Nut	<i>Juglans regia</i>	—	14.72 ± 0.09
Pistachio	<i>Pistacia vera</i>	—	14.46 ± 0.03
Almond	<i>Prunus amygdalus</i>	—	14.28 ± 0.04
Pine nut	<i>Pinus pinea</i>	—	16.22 ± 0.02
Peanut	<i>Arachis hypogaea</i>	—	13.52 ± 0.01
Hazelnut	<i>Corylus avellana</i>	—	16.91 ± 0.04

Notes: <sup>a</sup>Average  $C_p \pm SD$  are shown from triplicate PCR reactions from each DNA extraction. A minus sign indicates no positive signal after 50 PCR cycles.

12S rRNA PSS=porcine-specific system on the 12S rRNA gene (*P12SDIR/P12SINV* and *P12SP*).

18S rRNA PAC=positive amplification control (*18SDIR/18SINV* and *18SP*) for the porcine system on the 18S rRNA gene.

primers yielding the highest endpoint fluorescence and the lowest  $C_p$  were experimentally determined for each set of primers: 300 nM for forward primers and 900 nM for reverse primers. The PCR reactions were performed with the LightCycler TaqMan Master<sup>®</sup> (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany), 2 pmol of each TaqMan probe (TibMolBiol), and 2 µl of extracted DNA. Amplification reactions were done in a total reaction volume of 10 µl in a glass capillary tube and were run on the LightCycler<sup>®</sup> 2.0 Instrument (Roche Applied Science, Penzberg, Germany) with the

following programme: 10 min at 95°C (denaturation and Taq polymerase activation), an amplification programme of 50 cycles at 95°C for 10 s, 60°C for 30 s and 72°C for 1 s. Samples were then cooled to 40°C for 30 s. This programme was used to amplify the species-specific PCR system, along with the positive amplification control. Unless otherwise indicated, all real-time PCR reactions were carried out in triplicate for each DNA extract.

The crossing point value ( $C_p$ ), which refers to the cycle number where the sample's fluorescence



Table 2. DNA sequences and description of the primers and probes used in this study.

Primers	Length (bp)	Sequence (5' → 3')	Description	Target gene	Fragment length (bp)
P12SDIR	23	GTCACCCTCCTCAAGCATGTAGT	Porcine-specific forward primer	12S rRNA	79
P12SINV	23	GTTACGACTTGTCTCTTCGTGCA	Porcine-specific reverse primer		
18SDIR	16	TGGTGCCAGCAGCCGC	Positive control forward primer	18S rRNA	77
18SINV	25	TCCAACCTACGAGCTTTTAACTGCA	Positive control reverse primer		
Probes					
P12SP	22	6FAM-ACCTATATTCA+ATT +A+CA+CAA+CC-BBQ	Porcine probe	12S rRNA	
18SP	22	6FAM-CGCTATTGGA+G+CT +G+GAATTACC-BBQ	Universal probe	18S rRNA	

Note: A "+" symbol denotes the LNA (locked nucleic acid) bases.

significantly increases above the background level, was calculated automatically by the LightCycler® software as the first maximum of the second derivative of the curve. The continual measurement of fluorescence is related to the amount of amplicon in the real-time PCR, yielding a qualitative result on the presence of the target species.

#### Construction of standard curves and data analysis

To assess the efficiency, linear range and analytical sensitivity of the porcine real-time PCR system, standard curves were constructed using two sets of reference feeds (Table 3: intestines plus bones, R1–R4; carcase, R5–R9) rendered under homogeneous conditions and containing increasing amounts of target material. The amount of target DNA in an unknown sample can be then measured by extrapolation of the  $C_p$  value obtained in the unknown sample in the corresponding standard curve of  $C_p$  values generated from known DNA percentages of the target species. In addition, the correlation between the variables, crossing point ( $C_p$ ) and concentration ([I]) is semilogarithmic:

$$C_p = b \log[I] + a$$

where  $b$  is the slope; and  $a$  is the intercept.

Linearity test, sensitivity, accuracy and precision parameters the porcine-specific real-time PCR system were evaluated according to previously described methods (Camacho et al. 1993; International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH) 2005; Bustin et al. 2009). To carry out the validation of the real-time PCR system, three separate DNA extractions were assayed in different days, using three replicates of each sample. Precision of

the assay was evaluated by comparing the coefficient of variation (CV) values obtained in three different days versus those obtained in the same day, to assess the influence of random events (day of analysis, analyst, equipment, etc.) in the data obtained from the feed samples.

## Results

### Specificity

The porcine real-time PCR system was tested for their selectivity and cross-reactivity by analysis of genomic DNA extracted from tissues of 27 animal species (mammals, fish and birds) and 14 plant species. As can be seen in Table 1, the porcine real-time PCR system positively detected the target species, while no amplification signal was obtained on the non-target animal and plant species tested. The 18S rRNA eukaryotic system amplified DNA from all eukaryotic samples tested.

### Sensitivity analysis of reference and blind industrial feeds

The sensitivity of the porcine real-time PCR system was firstly evaluated in two arrays of reference feeds rendered at 133°C and containing different amounts of target material (intestines plus bones: R1–R4 and carcase: R5–R10). Plus, two other porcine tissue-types treated at 133°C were included in the reference set analysis (muscle: R14 and bones: R18–R19). The presence of porcine material was successfully detected in all the tested reference feeds, even at the 0.1% target level. However, variable  $C_p$  values were registered depending on the nature of the tissue present ( $C_p$  values of 23.03, 24.79, 30.48 and 34.69 for the 1% of

Table 3. Real-time PCR results obtained with the 12S rRNA porcine-specific system and 18S rRNA positive amplification control (PAC) for industrial feed samples processed at temperatures from 133 to 159°C.

Reference	Description of PAPs				Real-time PCR results( $C_p$ ) <sup>a</sup>	
	Target material	Content (%)	T (°C)	Non-target material	PSS	PAC
R1	Porcine int <sup>b</sup> + bones <sup>c</sup> (50/50)	0.1	133	Chicken MBM	28.90 ± 0.05	18.77 ± 0.07
R2	Porcine int + bones (50/50)	0.2	133	Chicken MBM	27.77 ± 0.04	18.24 ± 0.02
R3	Porcine int + bones (50/50)	1	133	Chicken MBM	24.79 ± 0.00	18.50 ± 0.06
R4	Porcine int + bones (50/50)	5	133	Chicken MBM	22.77 ± 0.01	18.23 ± 0.03
R5	Porcine carcass <sup>d</sup>	0.1	133	Poultry meal	33.42 ± 0.09	17.20 ± 0.06
R6	Porcine carcass	0.2	133	Poultry meal	32.57 ± 0.05	19.87 ± 0.05
R7	Porcine carcass	0.5	133	Poultry meal	31.34 ± 0.03	17.36 ± 0.06
R8	Porcine carcass	1	133	Poultry meal	30.48 ± 0.02	18.04 ± 0.08
R9	Porcine carcass	2	133	Poultry meal	28.71 ± 0.02	18.10 ± 0.02
R10	Porcine carcass	100	133	–	19.94 ± 0.00	22.65 ± 0.06
R11	Porcine carcass	0.2	137	Poultry meal	35.93 ± 0.08	17.22 ± 0.02
R12	Porcine carcass	0.2	141	Poultry meal	38.66 ± 0.06	17.34 ± 0.08
R13	Porcine carcass	0.2	145	Poultry meal	39.73 ± 0.04	18.01 ± 0.05
R14	Porcine muscle <sup>e</sup>	1	133	Chicken int + bones	34.69 ± 0.01	19.91 ± 0.03
R15	Porcine muscle	0.2	137	Chicken int + bones	36.89 ± 0.09	19.27 ± 0.04
R16	Porcine muscle	0.2	141	Chicken int + bones	39.87 ± 0.06	18.35 ± 0.09
R17	Porcine muscle	0.2	145	Chicken int + bones	39.18 ± 0.08	18.66 ± 0.01
R18	Porcine bones	1	133	Chicken int + bones	23.03 ± 0.03	18.95 ± 0.07
R19	Porcine bones	100	133	–	14.46 ± 0.03	16.33 ± 0.07
<i>Blind</i>						
S65	Porcine bones	0.1	133	Chicken int + bones	27.62 ± 0.08	18.56 ± 0.04
S66	Porcine bones	0.5	133	Chicken int + bones	24.09 ± 0.03	19.01 ± 0.02
S67	Porcine bones	1	133	Chicken int + bones	21.73 ± 0.06	17.91 ± 0.00
S68	Porcine bones	2	133	Chicken int + bones	20.87 ± 0.01	18.97 ± 0.00
S8, S11, S14	Porcine bones	100	133	–	18.83 ± 0.23 <sup>f</sup>	15.81 ± 0.12 <sup>f</sup>
S10, S12, S13, S15	Porcine bones	100	159	–	26.83 ± 0.42 <sup>f</sup>	28.60 ± 0.38 <sup>f</sup>
S71	Porcine int + bones (50/50)	0.5	133	Chicken MBM	26.81 ± 0.06	19.11 ± 0.07
S73	Porcine int + bones (50/50)	1	133	Pig feed	24.12 ± 0.01	13.13 ± 0.00
S74	Porcine int + bones (50/50)	2	133	Chicken int + bones	22.79 ± 0.03	17.21 ± 0.06
S75	Porcine int + bones (50/50)	2	133	Chicken MBM	23.66 ± 0.02	22.01 ± 0.09
S76	Porcine int + bones (50/50)	5	133	Pig feed	18.64 ± 0.03	12.83 ± 0.07
S77	Porcine int + bones (50/50)	5	133	Chicken int + bones	21.89 ± 0.02	18.71 ± 0.09
S79–S84	Porcine int + bones (50/50)	5	133	Ovine PAP + chicken feed	21.60 ± 0.55 <sup>f</sup>	13.81 ± 1.07 <sup>f</sup>
S16–S19	Porcine int + bones (50/50)	100	133	–	18.66 ± 0.17 <sup>f</sup>	16.23 ± 0.01 <sup>f</sup>
S20–S22	Porcine int + bones (20/80)	100	133	–	13.82 ± 0.02 <sup>f</sup>	18.44 ± 0.02 <sup>f</sup>
S88	Porcine carcass	0.5	133	Chicken int + bones	27.00 ± 0.05	17.91 ± 0.03
S90	Porcine carcass	1	133	Poultry meal	28.90 ± 0.03	18.64 ± 0.08
S109	Porcine carcass	5	133	Bovine MBM + pig feed	20.91 ± 0.01	14.03 ± 0.08
S23–S26	Porcine carcass	100	133	–	21.95 ± 0.19 <sup>f</sup>	26.07 ± 0.12 <sup>f</sup>
S92	Porcine carcass	0.1	137	Chicken int + bones	39.82 ± 0.09	18.45 ± 0.01

S94	Porcine carcass	1	137	Chicken int + bones	32.88 ± 0.04	17.56 ± 0.02
S27-S31	Porcine carcass	100	137	—	25.65 ± 0.04 <sup>f</sup>	28.24 ± 0.11 <sup>f</sup>
S95	Porcine carcass	0.1	141	Chicken int + bones	38.59 ± 0.09	19.42 ± 0.03
S32	Porcine carcass	100	141	—	27.91 ± 0.06	28.63 ± 0.05
S97	Porcine carcass	0.1	145	Chicken int + bones	43.96 ± 0.05	17.51 ± 0.02
S33	Porcine carcass	100	145	—	29.67 ± 0.07	29.59 ± 0.07
S102	Porcine muscle	1	137	Chicken int + bones	31.23 ± 0.01	18.32 ± 0.02
S103	Porcine muscle	0.1	141	Chicken int + bones	39.18 ± 0.06	19.66 ± 0.01
S105	Porcine muscle	1	141	Avian carcass	35.03 ± 0.02	22.12 ± 0.03
S106	Porcine muscle	0.1	145	Chicken int + bones	43.15 ± 0.08	18.27 ± 0.09
S108	Porcine muscle	1	145	Chicken int + bones	35.93 ± 0.05	18.32 ± 0.04
S34	Porcine muscle	100	133	—	21.55 ± 0.00	25.45 ± 0.10
S35-S37	Porcine muscle	100	137	—	26.55 ± 0.06 <sup>f</sup>	25.79 ± 0.21 <sup>f</sup>
S38	Porcine muscle	100	141	—	28.35 ± 0.01	27.56 ± 0.07
S39	Porcine muscle	100	145	—	30.10 ± 0.03	33.32 ± 0.11
S1, S4, S6	Porcine int	100	133	—	19.29 ± 0.55 <sup>f</sup>	25.65 ± 0.78 <sup>f</sup>
S2, S3, S5, S7	Porcine int	100	159	—	30.03 ± 0.11 <sup>f</sup>	32.83 ± 0.40 <sup>f</sup>
S40-S42	Porcine greaves meal	100	133	—	17.83 ± 0.13 <sup>f</sup>	18.18 ± 0.04 <sup>f</sup>
S43-S45	Porcine protein A	100	UD	—	28.86 ± 0.27 <sup>f</sup>	30.09 ± 0.03 <sup>f</sup>
S46-S56	Porcine protein B	100	UD	—	24.53 ± 0.32 <sup>f</sup>	25.55 ± 0.63 <sup>f</sup>
S57-S62	Porcine meat meal	100	UD	—	13.63 ± 0.27 <sup>f</sup>	18.21 ± 0.13 <sup>f</sup>
S63, S64	Porcine bone protein	100	UD	—	14.82 ± 0.08 <sup>f</sup>	18.82 ± 0.20 <sup>f</sup>
Rest of the samples ( <i>n</i> = 80)	Not declared			Poultry, bovine and/or ovine PAPs		

Notes: Reference and blind samples were provided by the Co-operative Central Laboratory "CCL-Nutricontrol" (the Netherlands) and are rearranged in this table according to temperature, matrix and target percentage characteristics.

<sup>a</sup>Average  $C_p \pm SD$  shown from triplicate PCR reactions from each DNA extraction.

<sup>b</sup>Int (intestines): 100% mechanically washed large intestines.

<sup>c</sup>Bones: 100% bones from tails, legs and trotters.

<sup>d</sup>Carcass: 50% bone, 20% muscle, 20% fatty tissue and 10% connective tissue/blood.

<sup>e</sup>Muscle: 100% muscle, blood (in muscle) and a trace of fat.

<sup>f</sup>Average  $C_p \pm SD$  shown from triplicate PCR reactions of DNAs from blind samples with identical features but analysed under different codes. MBM, meat and bone meal; PAC, positive amplification control (*18S* rRNA gene; PSS, porcine-specific system on the 12S rRNA gene (*P12SDIR*/*P12SINV* and *P12SP*); and UD, undetermined (no information supplied).

1408 N. Pegels et al.

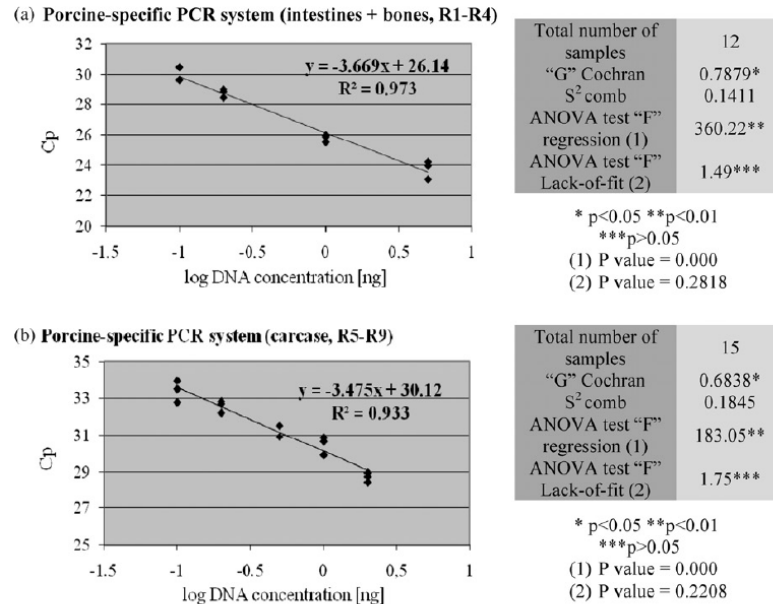


Figure 1.  $C_p$  values obtained from porcine intestines plus bones (a) and carcase (b) reference samples plotted versus the logarithm of the DNA concentrations. Linearity test, regression line and sensitivity parameters are calculated for the porcine-specific PCR system.

bones, intestines plus bones, carcase and muscle, respectively) (Table 3).

Once the sensitivity criteria was achieved down to the 0.1% target level rendered at 133°C, the influence of more extreme rendering conditions in assay sensitivity was studied through analysis of porcine carcase and porcine muscle reference feeds containing 0.2% target and heated at 137, 141 and 145°C. Results obtained in both feed-types show a clear increase in the  $C_p$  values as the pressure sterilisation becomes more drastic, restricting the sensitivity of the assay.

To evaluate further the sensitivity and applicability of the porcine real-time PCR, an extensive testing was performed on a batch of 171 blind industrial feeds manufactured at temperatures ranging from 133 to 159°C and spiked with various concentrations (0.1–100%) of different porcine tissues. Once analyses were completed, the European laboratory (CCL-Nutricontrol, Veghel) provided the data on the real composition and processing treatment of the blind feed samples (Table 3). Similarly to the reference feeds, the  $C_p$  values achieved in the blind trial varied (for equivalent amounts of target) according to the tissue and processing temperature applied to the feeds. Overall, the porcine real-time PCR system yielded a homogeneous positive  $C_p$  value in all the industrial feeds declared to contain porcine material (91 of the 171 blind samples, with  $C_p$  values ranging from 13.63

to 43.96), evidencing a total qualitative agreement with the feed composition description. However, particularly high  $C_p$  values (>40) were achieved in two samples with the lowest porcine percentage (0.1%) and treated at 145°C (S97 and S106), reflecting a much higher level of DNA fragmentation at this temperature compared with the less stringent heating conditions. No fluorescence signal was observed in 47% of the 171 blind feed samples. Such feeds were described by the provider laboratories as pure or mixed PAPs from either avian, bovine and/or ovine origin, satisfying the desired specificity requirements. All the feeds analysed in this work were amplified successfully with the 18S rRNA eukaryotic system.

#### Quantitative potential of the assay

The regression line of  $C_p$  values obtained from the two sets of matrix-matched reference feeds (intestines plus bones: R1–R4 and carcase: R5–R9) treated at 133°C and spiked with increasing levels of porcine material were used to determine the PCR amplification efficiency and the linear dynamic range of the porcine real-time PCR system. As shown in Figure 1(a) and (b), the resulting theoretical slopes of both porcine standard curves showed values near to the slope's value of –3.32, corresponding to a 100% PCR efficiency in each cycle.



The following validation parameters were also determined and statistically evaluated: (1) Cochran's test, which determined whether the variances of the responses obtained for each concentration of the target DNA in the reference feeds were homogeneous; (2) regression analysis; and (3) variance analysis with lack of fit. All parameters were evaluated following previously described validation protocols (Figure 1) (Camacho et al. 1993; ICH 2005).

The accuracy of the porcine PCR assays was determined from the percentages of each set of reference PAPs (0.1%, 0.2%, 1% and 5% for intestines plus bones, and 0.1, 0.2, 0.5, 1 and 2% for carcass, respectively). Accuracy is reported as percentage recovery by the assay of known added amounts of analyte. Using the Snedecor *F*-test, it was verified that the concentration of DNA present in a sample did not affect the variation of the results. The values for the Student's *t*-test obtained demonstrated that the method was accurate, since no significant differences between 100% and the mean recovery values were detected. The repeatability (short-term precision) of the assay was determined based upon the standard deviation in  $C_p$  values generated from three replicates of the reference feeds analysed in the same run. The results indicated that  $C_p$  values have an acceptable level of repeatability over all magnitudes of target DNA concentrations. The influence of day of analysis on the precision of the assay (long-term precision) was also tested by comparing the coefficients of variation (CV) of three separate DNA extractions performed on the 0.1% porcine reference feeds, analysed in triplicate three times on the same day, versus the values obtained for the same samples on 3 different days. Results showed significant differences with higher CV values when the assay was done on different days with respect to the same day. Thus, a standard curve should be determined on each day of analysis.

Results obtained indicate that the real-time PCR technique developed has the quantitative potential for detection of porcine PAP in feeds, given the positive correlation between the fluorescence values and the concentration of porcine DNA in reference feeds. However, in order to assess the real capability of the technique to quantify the content of porcine material in a sample, a comprehensive analysis of the industrial blind feeds was conducted, involving extrapolation of blind sample  $C_p$  data using the linear regression equations of the reference curves. Results indicated that the estimated porcine content achieved using the corresponding calibration equations usually do not correlate with the actual (declared) content of the sample (data not shown). Therefore, it was not possible to establish a straightforward quantitative correlation between the fluorescence values obtained in an unknown (blind) sample and the amount of target contained in the sample.

## Discussion

In the context of BSE prevention, the identification of non-ruminant animal species (i.e. pig and poultry) within animal feeds is one of the imperative issues considering the possible partial amendment of the European total feed ban towards the re-entry of non-ruminant PAPs in feeds. Acknowledging this, the aim of the present work was the development and application of a TaqMan real-time PCR method for the specific identification of porcine PAPs in feedstuffs.

Specificity and sensitivity are important indices of performance of real-time PCR analysis used to detect the presence of banned PAPs in feeds. The real-time PCR system developed here achieved the required specificity to selectively detect porcine processed material in feedstuffs (Table 1). With this preliminary basis, all the feeds analysed, including different animal species and tissue-types subjected to various processing treatments, could be correctly classified as positive or negative for porcine content, even in the case of the lowest porcine percentages (0.1%) treated at temperatures as high as 145°C (Table 3). This achievement is noteworthy because a large fraction of feed PAPs are severely processed materials for which the DNA extraction yield is generally poor due to the extensive template fragmentation during feed rendering. This, in turn, may reduce the sensitivity of the analysis affecting the result of qualitative and quantitative PCR assays (Yoshida et al. 2009; Gryson 2010).

In order to allow PCR detection on feeds harbouring highly damaged DNAs, oligonucleotide design based on very short fragments is of crucial importance. In this work, a porcine-specific primer pair was used to amplify very small DNA products (79 bp length), providing the technique with high sensitivity potential. Besides, a TaqMan LNA (locked nucleic acid) probe was designed internal to the 79 bp amplicon. Two types of fluorescent chemistries, specific TaqMan® probes and the non-specific dye SYBR Green®, are among the preferred platforms for real-time PCR assays applied to detection of banned PAPs in feeds (Mendoza-Romero et al. 2004; Martín et al. 2009). SYBR Green® assays perform well, but their non-specific nature implies some limitations compared to TaqMan-dependent methods, such as lower repeatability between parallels and weaker assay specificity with the need of additional confirmatory tests based on melting temperature analysis (Bellagamba et al. 2006; Gašparič et al. 2010; Rojas et al. 2011). Within TaqMan-based procedures, the novel type of nucleic acid analogue, i.e. locked nucleic acid (LNA), represent a good alternative to other probe chemistries due to its increased thermal stability, improved hybridisation specificity and opportunity for shorter length amplifications (Kubota et al. 2006; Gašparič et al. 2010).

One of the major global achievements of this work is the successful real-time PCR detection of porcine target material in a wide assortment of industrially manufactured feeds subjected to rendering processes involving a range of extreme temperatures (from 133°C to 159°C). This is of significant meaning, especially when compared with other reported porcine PCR-based approaches that test either laboratory-scale prepared feeds that do not reproduce the commercial manufacturing procedures, or samples for which the exact origin, composition and/or preparation are not entirely specified (Colgan et al. 2001; Tajima et al. 2002; Dalmaso et al. 2004; Bellagamba et al. 2006). In this work, a total of 190 feeds (reference plus blind) representative of the real-world feed ingredients were examined, meeting the desired specificity and sensitivity demands and evidencing the powerful qualitative potential of the described real-time PCR protocol.

Quantification of PAPs in compound feeds is a challenging task (Fumière et al. 2009). In order to assess the quantitative capacity of the porcine real-time PCR system, extrapolation analysis of the  $C_p$  data obtained for the blind feeds was carried out upon the linear regression equations of the reference curves. Results obtained (not shown) indicated a high degree of fluctuation in PCR amplification efficiency depending on the sample, denoting a notably discordance between the porcine amounts detected and the amounts declared in most of the industrial feeds analysed. The kind of heat treatment conditions applied to the feeds is one of the most important factors which may affect the amount and quality of amplifiable DNA, causing quantification uncertainty. Because European legislation only specifies the minimum treatment requirement (133°C), the real temperature and pressure conditions will vary amongst the different rendering systems and the exact impact of sterilisation cannot be established. Nevertheless, even beyond any quantitative attempt, it is essential that every real-time PCR system aimed to detect PAPs in feeds evaluates as wider as possible representation of samples treated at different rendering conditions to verify its applicability. In this study, a broad selection of porcine materials from different origins and processed at 133, 137, 141, 145 or 159°C for 20 min at hyperbaric pressures were effectively detected with the developed real-time PCR.

Another factor that affect real-time PCR quantification is the type of PAP present in the feed, given that the number of cells and, consequently, of template DNA, is variable depending on the tissue (carcase, muscle, bone, etc.). As shown in Table 3, feeds comprising bone tissues ("bones" and "intestine plus bones") yield the lowest  $C_p$  values compared to other tissue types, such as carcase and muscle, treated at the same temperature. These observations are in line with other works that argue that survival of nucleic acids to

drastic processes is particularly manifested in bones, where the adsorption of DNA to hydroxyapatite and the three-dimensional packaging of the macromolecule within the tissue could have a crucial role in DNA preservation (Collins et al. 2002; Götherström et al. 2002; Fumière et al. 2009). As a result of these considerations, a given blind feed containing a high proportion of banned animal material and treated at temperatures higher than 133°C (e.g. sample S15, 159°C) could be misidentified as another feed containing a lower amount of target, but treated at a lower temperature (e.g. sample R6, 133°C). These confusion could be problematic in the context of the current contentious debate in the European Commission towards ruling out the "tolerance zero" concept, once porcine and avian material are allowed in the production of animal feedstuffs.

Finally, it should be stressed that real-time PCR methods are universally used and can be integrated in a global analytical strategy with other methods applied in the EU (e.g. near infrared microscopy and imaging or immunology) to determine if the presence of animal constituents in feed is conform or not to the European legislation (Fumière et al. 2010).

### Conclusions

The porcine TaqMan real-time PCR system developed herein allows specific and sensitive identification of porcine PAPs in highly processed industrial feeds, with a good detection limit (0.1%). Quantitative application of the real-time PCR technique is limited by the existing variability in terms of processing conditions and kind of ingredients that can be used in the feed industry. However, the assay could be employed as a rapid qualitative diagnostic tool to complement other methods used by European regulatory agencies for accurately detecting small amounts of porcine-prohibited material in farmed animal feed.

### Acknowledgements

The authors are indebted to Dr R. Margry from CCL-Nutricontrol (the Netherlands) for kindly providing the industrial feed samples analysed in this study. This work was supported by the Programa de Vigilancia Sanitaria (2009/AGR/1489) of the Comunidad de Madrid (Spain) and by a project (AGL2010/15279) from the Ministerio de Ciencia e Innovación (Spain). Nicolette Pegels is recipient of a fellowship from the Ministerio de Educación (Spain).

### References

- Bellagamba F, Comincini S, Ferretti L, Valfre F, Moretti VM. 2006. Application of quantitative real-time PCR in the detection of prion-protein gene species-specific



- DNA sequences in animal meals and feedstuffs. *J Food Prot.* 69:891–896.
- Bottero MT, Dalmaso A, Nucera D, Turi RM, Rosati S, Squadrone S, Goria M, Civera T. 2003. Development of a PCR assay for the detection of animal tissues in ruminant feeds. *J Food Prot.* 66:2307–2312.
- Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL, et al. 2009. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem.* 55:611–622.
- Camacho MA, Torres AI, Gil-Alegre ME, Obregón MM, Ruz V. 1993. Validation protocol of analytical methods for finished pharmaceutical products. *STP Pharma Pratiques.* 3:197–202.
- Cawthraw S, Saunders GC, Martin TC, Sawyer J, Windl O, Readney SD. 2009. Real-time PCR detection and identification of prohibited mammalian and avian material in animal feeds. *J Food Prot.* 72:1055–1062.
- Colgan S, O'Brien L, Maher M, Shilton N, McDonnell K, Ward S. 2001. Development of a DNA-based assay for species identification in meat and bone meal. *Food Res Int.* 34:409–414.
- Collins MJ, Nielsen-Marsh CM, Hiller J, Smith CI, Roberts JP, Prigodich RV, Wess TJ, Csapò J, Millard AR, Turner-Walker G. 2002. The survival of organic matter in bone: a review. *Archaeometry.* 44:383–394.
- Dalmaso A, Fontanella E, Piatti P, Civera T, Rosati S, Bottero MT. 2004. A multiplex PCR assay for the identification of animal species in feedstuffs. *Mol Cell Probes.* 18:81–87.
- EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). 2011. Scientific opinion on the revision of the quantitative risk assessment (QRA) of the BSE risk posed by processed animal proteins (PAPs). *EFSA Journal.* 9:1947–2026.
- European Commission. 2003. Commission Regulation 2003/1234/EC of 10 July 2003 amending annexes I, IV and XI to Regulation 2001/999/EC of the European Parliament and of the Council and Regulation 2000/11326/EC as regards transmissible spongiform encephalopathies and animal feeding. *Off J Eur Comm.* L173:6–13.
- European Commission. 2009a. Commission Regulation 2009/1069/EC of 21 October 2009 laying down laying down health rules as regards animal by-products and derived products not intended for human consumption and repealing Regulation (EC) No 1774/2002 (Animal by-products Regulation). *Off J Eur Comm.* L300:1–33.
- European Commission. 2009b. Commission Regulation 2009/152/EC of 27 January 2009 laying down the methods of sampling and analysis for the official control of feed. *Off J Eur Comm.* L54:1–130.
- Frezza D, Giambra V, Chegdani F, Fontana C, Maccabiani G, Losio N, Faggionato E, Chiappini B, Vaccari G, von Holst C, et al. 2008. Standard and Light-Cycler PCR methods for animal DNA species detection in animal feedstuffs. *Innov Food Sci Emerg Technol.* 9:18–23.
- Fumière O, Dubois M, Baeten V, von Holst C, Berben G. 2006. Effective PCR detection of animal species in highly processed animal byproducts and compound feeds. *Anal Bioanal Chem.* 385:1045–1054.
- Fumière O, Marien A, Fernández Pierna JA, Baeten V, Berben G. 2010. Development of a real-time PCR protocol for the species origin confirmation of isolated animal particles detected by NIRM. *Food Addit Contam A.* 27:1118–1127.
- Fumière O, Veys P, Boix A, von Holst C, Baeten V, Berben G. 2009. Methods of detection, species identification and quantification of processed animal proteins in feedingstuffs. *Biotechnol Agron Soc Environ.* 13:59–70.
- Gašparič MB, Tengs T, la Paz JL, Holst-Jensen A, Pla M, Esteve M, Žel J, Gruden K. 2010. Comparison of nine different real-time PCR chemistries for qualitative and quantitative applications in GMO detection. *Anal Bioanal Chem.* 396:2023–2029.
- Gizzi G, van Raamsdonk LWD, Baeten V, Murray I, Berben G, Brambilla G, von Holst C. 2003. An overview of tests for animal tissues in feeds applied in response to public health concerns regarding bovine spongiform encephalopathy. *Rev Off Int Epizoot.* 22:311–331.
- Götherström A, Collins MJ, Angerbjörn A, Lidén K. 2002. Bone preservation and DNA amplification. *Archaeometry.* 44:395–404.
- Gryson N. 2010. Effect of food processing on plant DNA degradation and PCR-based GMO analysis: a review. *Anal Bioanal Chem.* 396:2003–2022.
- Hahn H. 1999. Animal meal: production and determination in feedstuffs and the origin of bovine spongiform encephalopathy. *Naturwissenschaften.* 86:62–70.
- International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH). 2005. Harmonised tripartite guideline. Validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1); [cited 2011 Dec]. Available from: [http://www.ich.org/fileadmin/Public\\_Web\\_Site/ICH\\_Products/Guidelines/Quality/Q2\\_R1/Step4/Q2\\_R1\\_Guideline.pdf](http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1_Guideline.pdf)
- Kubota K, Ohashi A, Imachi H, Harada H. 2006. Improved in situ hybridization efficiency with locked-nucleic-acid-incorporated DNA probes. *Appl Environ Microbiol.* 72:5311–5317.
- Martín I, García T, Fajardo V, Rojas M, Pegels N, Hernández PE, González I, Martín R. 2009. SYBR-green real-time PCR approach for the detection and quantification of pig DNA in feedstuffs. *Meat Sci.* 82:252–259.
- Mendoza-Romero L, Verkaar ELC, Savelkoul PH, Catsburg A, Aarts HJM, Buntjer JB, Lenstra L. 2004. Real-time PCR detection of ruminant DNA. *J Food Prot.* 67:550–554.
- Momcilovic D, Rasooly A. 2000. Detection and analysis of animal materials in food and feed. *J Food Prot.* 63:1602–1609.
- Pegels N, González I, Martín I, Rojas M, García T, Martín R. 2011. Applicability assessment of a real-time PCR assay for the specific detection of bovine, ovine and caprine material in feedstuffs. *Food Control.* 22:1189–1196.
- Prado M, Berben G, Fumière O, van Duijn G, Mensinga-Kruize J, Reaney S, Boix A, von Holst C. 2007. Detection of ruminant meat and bone meals in animal feed by real-time polymerase chain reaction: result of an interlaboratory study. *J Agric Food Chem.* 55:7495–7501.

1412 N. Pegels et al.

- Prado M, Fumière O, Boix A, Marien A, Berben G, von Holst C. 2009. Novel approach for interlaboratory transfer of real-time PCR methods: detecting bovine meat and bone meal in feed. *Anal Bioanal Chem.* 394:1423–1431.
- Rojas M, González I, Pavón MA, Pegels N, Hernández PE, García T, Martín R. 2011. Application of a real-time PCR assay for the detection of ostrich (*Struthio camelus*) mislabelling in meat products from the retail market. *Food Control.* 22:523–531.
- Tajima K, Osamu E, Amari M, Mitsumori M, Kajikawa H, Kurihara M, Yanai S, Matsui H, Yasue H, Mitsuhashi T, et al. 2002. PCR detection of DNAs of animal origin in feed by primers based on sequences of short and long interspersed repetitive elements. *Biosci Biotechnol Biochem.* 66:2247–2250.
- van Raamsdonk L, Pinotti L, Veys P, Bremer M, Hekman W, Kemmers A, Campagnoli A, Paltanin C, Belinchón-Crespo C, Vliege J, et al. 2011. New developments in classical microscopy; what can be expected for the official control? *Biotechnol Agron Soc Environ.* 15:15–24.
- Yancy HF, Washington JD, Callahan L, Mason JA, Deaver CM, Farrell DE, Ha T, Sespico E, Falmlen D, Myers MJ. 2009. Development, evaluation, and peer verification of a rapid real-time PCR method for the detection of animal material. *J Food Prot.* 72:2368–2374.
- Yoshida T, Nomura T, Shinoda N, Kusama T, Kadowaki K, Katsuaki S. 2009. Development of PCR primers for the detection of porcine DNA in feed using mtATP6 as the target sequence. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi.* 50:89–92.



## Evaluation of a TaqMan real-time PCR assay for detection of chicken, turkey, duck, and goose material in highly processed industrial feed samples

N. Pegels, I. González,<sup>1</sup> I. López-Calleja, S. Fernández, T. García, and R. Martín

*Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain*

**ABSTRACT** A TaqMan real-time PCR method based on nucleotide sequence variation in the D-loop and 12S rRNA mitochondrial genes has been developed for the specific detection of chicken, turkey, duck, and goose prohibited material in animal feeds. The assay uses 4 primer/probe sets targeting short species-specific mitochondrial sequences together with a positive amplification control based on the eukaryotic 18S rRNA gene. The applicability of the real-time PCR assay was assessed through analysis of a batch of industrial feed samples subjected to different rendering temperatures according to European legislation regulations. The chicken-specific real-time PCR system allows a highly sensitive qualitative detection of chicken-derived pro-

cessed animal protein from different tissue-type origins, even in samples containing 0.1% target and subjected to heat treatments higher than 133°C. On the other hand, turkey, goose, and duck real-time PCR systems also allowed detection of as low as 0.1% target material in binary mixtures (muscle/oat) manufactured using the minimum legal requirements for sterilization temperatures (133°C). Quantification results, based on calibration standard curves, were very reproducible under the experimental conditions tested. However, the quantitative capability of the assay is limited by the existing variability in terms of composition and processing treatment of the feeds, which affect the amount and quality of amplifiable DNA.

**Key words:** poultry, processed animal protein, TaqMan real-time PCR, industrial feeds

2012 Poultry Science 91:1709–1719  
<http://dx.doi.org/10.3382/ps.2011-01954>

### INTRODUCTION

In response to bovine spongiform encephalopathy (BSE), species identification in feeds has been mainly aimed at assessing the safety risk derived from introduction of any animal material that might harm human or animal health (Pascoal et al., 2004). Because scientific data link the spread of BSE to the consumption of feed contaminated by the infected ruminant proteins (Frezza et al., 2003), the European Union (EU) has established a ban on the use of processed animal protein (PAP) in feed for farmed animals (European Commission, 2003; EFSA Panel on Biological Hazards, 2011). Initially, the ban was enacted to achieve one specific goal: to prevent ruminant species consuming ruminant proteins via compound feed (European Commission, 1994). However, shortcomings in its application, such as the risk of unintentional cross-contamination between ruminant feed and feed containing PAP intend-

ed for other species, led to the introduction of a total EU-wide suspension on the use of PAP in feeds for all farmed animals, with certain limited exceptions (European Commission, 2003). Currently, the EU is considering a partial lift of the ban to allow the re-entry of certain PAP into monogastric animal feed, assuming that the transmission risk of BSE from nonruminants to nonruminants is “very unlikely” (EFSA Panel on Biological Hazards, 2011). Other arguments in favor of considering the relaxation of the existing total ban in the EU are 1) PAP may be a source of proteins for non-ruminant farmed animals that need to be fed with high quality protein and 2) the recycling of PAP for their use in feeds might represent a sustainable alternative and can limit the negative environmental impact (Fumière et al., 2009; Oluyinka and Olayiwola, 2009; Woodgate et al., 2009). Nevertheless, a crucial prerequisite for any possible lift of the total feed ban on animal proteins is the existence of validated techniques that enable the detection of banned PAP throughout the feed chain, as well as to identify their origin at the species level (Gizzi et al., 2003; EFSA Panel on Biological Hazards, 2011).

At present, the official analytical method for the detection of PAP in feedstuffs is the microscopic examina-

©2012 Poultry Science Association Inc.

Received October 18, 2011.

Accepted March 16, 2012.

<sup>1</sup>Corresponding author: gonzalzi@vet.ucm.es

tion technique described in EC N° 152/2009 (European Commission, 2009a). Although specific and mostly unaffected by the rendering process, microscopic analysis offers very restricted species differentiation, limiting the identification essentially to animal class. Also, it is laborious, highly dependent on the analyst's expertise, and requires considerable cost and time (Gizzi et al., 2003). To overcome and complement the microscopy limitations, alternative methods have been developed for the identification of animal ingredients in compound feeds.

Molecular techniques based on either protein or DNA analysis are largely capable of differentiating animal species, but their performances are dependent on rendering conditions used at manufacture of animal materials (Momcilovic and Rasooly, 2000; Frezza et al., 2003). In this respect, there is a legal requirement for a severe heat treatment of animal offal in rendering plants including a hyperbaric heat-treatment step involving holding the material at 133°C and 3 bar for 20 min (European Commission, 2009b). Consequently, protein-based methods, such as immunoassays, are limited in their ability to detect PAP that have suffered denaturation during processing (Ansfield et al., 2000; Baeten et al., 2005). In contrast, DNA is a relatively stable molecule, being more able to withstand the severe heat conditions applied to animal by-products. Among DNA-based methods, PCR has been extensively applied for species identification in feedstuffs (Bellagamba et al., 2003; Frezza et al., 2003) and is currently the technique of choice to determine the origin of animal by-products present in a feed at the species level. More recent reports have focused on the use of real-time PCR for this purpose (Kremár and Rencová, 2005; Frezza et al., 2008; Yancy et al., 2009). Its conceptual and practical simplicity, together with its combination of speed, sensitivity, and specificity in a homogeneous assay, have made real-time PCR the "gold-standard" for detecting minute amounts of nucleic acids from highly degraded sources such as rendered material (Burns et al., 2005; Bustin et al., 2009). To achieve successful PCR amplification of the damaged DNA present in feeds, it is of crucial importance to work with amplicons of very short lengths.

The objective of this study was to develop a TaqMan real-time PCR method for the specific identification of the following avian species in feedstuffs: chicken (*Gallus gallus*), turkey (*Meleagris gallopavo*), duck (*Anas platyrhynchos* × *Cairina moschata*), and goose (*Anser anser*). The assay is based on selective PCR amplification of short mitochondrial D-loop and 12S rRNA gene sequences and was evaluated through the analysis of a wide representation of feed samples subjected to different rendering temperatures according to European regulations. The majority of the industrial feed samples examined contained PAP from chicken, given the importance of chicken meat production, especially from broilers, compared with other domestic bird species, such as turkey, duck, or goose.

## MATERIALS AND METHODS

### Sample Selection

Most of the feed test materials used in the present study (referred to as industrial feeds) were manufactured and sent to our laboratory by the Co-operative Central Laboratory (CCL-Nutricontrol, Veghel, the Netherlands) and consisted of different PAP, either pure or in a mixed feed matrix. These industrial feeds were 21 reference samples containing increasing concentrations (from 0.1 to 100%) of different chicken tissues: bones, carcass, and muscle, and a batch of 48 blind samples containing different concentrations of PAP from avian and nonavian species. Feeds were produced under strict controlled and recorded processing conditions. Avian material was treated at 125, 133, 137, 141, or 145°C during 20 min, at hyperbaric pressure.

Due to the unavailability of reference PAP from turkey, duck, and goose, 12 binary mixtures of animal tissues in a plant matrix (turkey muscle in oat, duck muscle in oat, and goose muscle in oat) were prepared in our laboratory for analysis. Animal tissues were processed in an autoclave in compliance with European regulations (133°C at 3 bar for 20 min). Temperature was checked by introducing a temperature data logger, mod EDI-85A/125A (Ebro Electronic GMBH & Co, Ingolstadt, Germany) in the autoclave, together with the muscle. Once the tissues were autoclaved and left to cool at room temperature, they were used to prepare the binary mixtures containing different percentages, 0.1, 1, and 5% (wt/wt), for each species in the oat matrix. Mixtures were made in a final weight of 100 g using a blender (Sunbeam Oster, FL).

A wide range of nontarget animal and plant species (Table 1) were also included for specificity control purposes. Muscle and other animal tissues were obtained from varied origins: beef, sheep, goat, horse, pork, rabbit, turkey, and chicken were provided by local slaughterhouses and retail shops; duck, goose, and game bird species were provided by Antonio de Miguel of Gourmet Food Distribution Company (Madrid, Spain); cat, dog, and rat were obtained from the Veterinary Hospital (Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, Spain); red deer, fallow deer, roe deer, and chamois were obtained from several Spanish meat-cutting installations. Besides, several fish and plant species samples were purchased from different local markets.

All animal specimens were morphologically identified by trained veterinarians. They were transported to the laboratory under refrigeration and were processed immediately or frozen at -85°C until used.

### DNA Extraction

Two hundred milligrams of each feed was homogenized with 860 µL of extraction buffer, pH 8.0 (10 mM Tris, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, and 1% SDS), 100 µL of 5 M guanidine hydrochloride, and 40 µL of 20

**Table 1.** Specificity of the real-time PCR systems [crossing point ( $C_p$ ) values obtained from 100 ng of DNA]<sup>1</sup>

Common name	Scientific name	D-loop C.S.S	D-loop T.S.S	12S rRNA D.S.S	12S rRNA G.S.S	18S rRNA P.A.C
Chicken	<i>Gallus gallus</i>	10.73 ± 0.01 <sup>2</sup>	— <sup>3</sup>	—	—	13.28 ± 0.06
Turkey	<i>Meleagris gallopavo</i>	—	10.34 ± 0.03	—	—	10.35 ± 0.00
Duck	<i>Anas platyrhynchos</i> × <i>Cairina moschata</i>	—	—	12.96 ± 0.05	—	12.59 ± 0.01
Goose	<i>Anser anser</i>	—	—	—	10.88 ± 0.02	12.85 ± 0.07
Quail	<i>Coturnix coturnix</i>	—	—	—	—	10.38 ± 0.03
Pheasant	<i>Phasianus colchicus</i>	—	—	—	—	12.77 ± 0.01
Partridge	<i>Alectoris rufa</i>	—	—	—	—	10.38 ± 0.08
Guinea fowl	<i>Numida meleagris</i>	—	—	—	—	12.67 ± 0.05
Ostrich	<i>Struthio camelus</i>	—	—	—	—	11.48 ± 0.01
Cattle	<i>Bos taurus</i>	—	—	—	—	10.14 ± 0.04
Sheep	<i>Ovis aries</i>	—	—	—	—	10.61 ± 0.09
Goat	<i>Capra hircus</i>	—	—	—	—	12.25 ± 0.05
Swine	<i>Sus scrofa domestica</i>	—	—	—	—	12.21 ± 0.02
Horse	<i>Equus caballus</i>	—	—	—	—	12.74 ± 0.01
Rabbit	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	—	—	—	—	13.32 ± 0.02
Cat	<i>Felis catus</i>	—	—	—	—	13.26 ± 0.00
Dog	<i>Canis familiaris</i>	—	—	—	—	13.63 ± 0.09
Rat	<i>Rattus norvegicus</i>	—	—	—	—	13.36 ± 0.00
Red deer	<i>Cervus elaphus</i>	—	—	—	—	10.69 ± 0.02
Roe deer	<i>Capreolus capreolus</i>	—	—	—	—	11.26 ± 0.01
Fallow deer	<i>Dama dama</i>	—	—	—	—	13.15 ± 0.06
Sardine	<i>Sardina pilchardus</i>	—	—	—	—	11.73 ± 0.02
Tuna	<i>Thunnus atlanticus</i>	—	—	—	—	11.56 ± 0.04
Trout	<i>Salmo fario</i>	—	—	—	—	10.88 ± 0.03
Monk fish	<i>Lophius piscatorius</i>	—	—	—	—	10.96 ± 0.00
Red mullet	<i>Mullus barbatus</i>	—	—	—	—	11.90 ± 0.06
Nile perch	<i>Perca fluviatilis</i>	—	—	—	—	10.75 ± 0.02
Barley	<i>Hordeum vulgare</i>	—	—	—	—	12.46 ± 0.08
Maize	<i>Zea mays</i>	—	—	—	—	12.09 ± 0.00
Oat	<i>Avena sativa</i>	—	—	—	—	10.75 ± 0.01
Soybean	<i>Glycine max</i>	—	—	—	—	11.41 ± 0.01
Rye	<i>Secale cereale</i>	—	—	—	—	11.82 ± 0.04
Wheat	<i>Triticum aestivum</i>	—	—	—	—	12.03 ± 0.07
Sunflower	<i>Helianthus annuus</i>	—	—	—	—	11.85 ± 0.00
Rice	<i>Oryza sativa</i>	—	—	—	—	13.79 ± 0.01
Nut	<i>Juglans regia</i>	—	—	—	—	11.09 ± 0.05
Pistachio	<i>Pistacia vera</i>	—	—	—	—	14.48 ± 0.01
Almond	<i>Prunus amygdalus</i>	—	—	—	—	13.95 ± 0.02
Pine nut	<i>Pinus pinea</i>	—	—	—	—	12.58 ± 0.06
Peanut	<i>Arachis hypogaea</i>	—	—	—	—	12.58 ± 0.06
Hazelnut	<i>Corylus avellana</i>	—	—	—	—	11.85 ± 0.03

<sup>1</sup>D-loop C.S.S: chicken-specific system on the D-loop gene (*CHDLOOPDIR/CHDLOOPINV* and *CHDLOOP*); D-loop T.S.S: turkey-specific system on the D-loop gene (*TDLOOPDIR/TDLOOPINV* and *TDLOOP*); 12S rRNA D.S.S: duck-specific system on the 12S rRNA gene (*D12SDIR/D12SINV* and *D12SP*); 12S rRNA G.S.S: goose-specific system on the 12S rRNA gene (*G12SDIR/G12SINV* and *G12SP*); P.A.C: positive amplification control (*18SDIR/18SINV* and *18SP*) on the 18S rRNA gene at 55°C (turkey, duck, and goose systems). Similar  $C_p$  values are generated at 50°C (chicken system).

<sup>2</sup>Average  $C_p$  value ± SD shown from triplicate PCR reactions from each DNA extraction.

<sup>3</sup>Minus sign indicates no positive signal after 50 PCR cycles.

mg/mL of proteinase K (Merck, Darmstadt, Germany) and incubated overnight at 55°C with shaking at 60 rpm. Then, the samples were left to cool at room temperature. Five hundred microliters of chloroform (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) were added to the lysate before centrifugation at  $16,438 \times g$  for 10 min. Genomic DNA from the clear aqueous supernatant obtained after the centrifugation (500  $\mu$ L) was purified using the Wizard DNA Clean-up System kit (Promega, Madison, WI) with a vacuum manifold, according to the manufacturer's instructions. The DNA was eluted in 100  $\mu$ L of sterile deionized water. The DNA concentration was measured with a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies Inc., Montchanin, DE). Unless otherwise stated, 3 DNA replicates were extracted from each feed sample. A negative control sample was included in every DNA extraction.

### Oligonucleotide Primers and Probes

The oligonucleotides used in the real-time PCR assay were designed on the basis of mitochondrial (D-loop and 12S rRNA) and nuclear 18S rRNA gene sequences from various animal and plant species available in the NCBI (National Center for Biotechnology Information) database.

Alignment and computer analysis of mitochondrial D-loop sequences allowed the design of chicken (*CHDLOOPDIR/CHDLOOPINV*) and turkey (*TDLOOPDIR/TDLOOPINV*)-specific primer pairs for the amplification of DNA fragments of 63 bp and 82 bp, respectively. For detection of duck and goose species, 2 pairs of primers were designed in the 12S rRNA gene (*D12SDIR/D12SINV* and *G12SDIR/G12SINV*) to obtain 2 products of 118 bp and 98 bp, respectively.



Table 2. The DNA sequences and description of the primers and probes used in this study

Item	Length (bp)	Sequence (5'→3')	Description	Target gene	Fragment length (bp)
<b>Primer</b>					
<i>CHDLOOPDIR</i>	20	AATCCCTCAAACTATACAAA	Chicken-specific forward primer	D-loop	63
<i>CHDLOOPINV</i>	30	ATGATAGAAATAACAAATAATATATATAT	Chicken-specific reverse primer		
<i>TDLOOPDIR</i>	23	GCATAAACCCACAAACAATAA	Turkey-specific forward primer	D-loop	82
<i>TDLOOPINV</i>	27	GGTTTCTTAATAAAATAGCAAAAA	Turkey-specific reverse primer		
<i>D12SDIR</i>	24	CATAATTAATACCTGTAAATGCC	Duck-specific forward primer	12S rRNA	118
<i>D12SINV</i>	24	GTGTAAGCTGAGTATTTGGGGTT	Duck-specific reverse primer		
<i>G12SDIR</i>	24	TCAAGGTATAGCCTATGGAGTCGA	Goose-specific forward primer	12S rRNA	98
<i>G12SINV</i>	22	CTAAATGCCCTTCCAGAAATG	Goose-specific reverse primer		
<i>18SDIR</i>	16	TGGTGCAGCAGCCGC	Positive control forward primer	18S rRNA	77
<i>18SINV</i>	25	TCCAACTACGAGCTTTTAACTGCA	Positive control reverse primer		
<b>Probe</b>					
<i>CHDLOOPP</i>	15	6FAM-ACGTTT+TA+T+C+G+T+A+T+AA-BBQ	Chicken probe	D-loop	
<i>TDLOOPP</i>	21	6FAM-ACGTTTCTGTTT+A+A+T+AT+A+T+A+CA-BBQ	Turkey probe	D-loop	
<i>D12SP</i>	28	6FAM-TCGTAAACAAGGTAAAGTACCGGAAGGT-BBQ	Duck probe	12S rRNA	
<i>G12SP</i>	30	6FAM-TATTCATAGGGACACCGAAGAACGCTGA-BBQ	Goose probe	12S rRNA	
<i>18SP</i>	22	6FAM-CGCTATTTGGA+G+CT+G+GAATTAC-BBQ	Universal probe	18S rRNA	

+Symbol denotes the LNA (locked nucleotide acids) bases.

Apart from the 4 avian-specific primer pairs, TaqMan probes (*CHDLOOPP*, *TDLOOPP*, *D12SP*, and *G12SP*) were designed to anneal within the gene fragment generated by amplification of the corresponding target (chicken, turkey, duck, and goose) and were labeled on the 5' end with the fluorescent reporter dye 6-carboxyfluorescein (FAM) and on the 3' end with the blackberry (BBQ) fluorescent quencher. TaqMan probes were designed and synthesized by TibMolBiol (Berlin, Germany).

As a positive amplification control of real-time PCR experiments, universal primers (*18SDIR/18SINV*) and probe (*18SP*) were designed on a conserved 18S rRNA gene fragment in all eukaryotic cells. This set of primers was expected to produce amplicons of the same length (approximately 77 bp) in all species analyzed in this work.

The EMMA program included in the EMBOSS software package version 2.0 and the Primer Express 2.0 software (Perkin-Elmer/Applied Biosystems Division, Foster City, CA) were used for sequence alignment and primer design. The sequences and description of every primer and probe used in this study are listed in Table 2.

### Real-Time PCR

Real-time PCR was run under generic cycling conditions. The optimum PCR concentrations of primers yielding the highest endpoint fluorescence and the lowest crossing point ( $C_p$ ) were experimentally determined for each set of primers: 300 nM for forward primers and 900 nM for reverse primers. The PCR reactions were carried out using the LightCycler TaqMan Master (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany), 2 pmol of each TaqMan probe (TibMolBiol), and 2  $\mu$ L of extracted DNA. Amplification reactions were performed in a total reaction volume of 10  $\mu$ L in a glass capillary tube and were run on the LightCycler 2.0 Instrument (Roche Applied Science, Penzberg, Germany) with the following program: 10 min at 95°C (denaturation and Taq polymerase activation), an amplification program of 50 cycles at 95°C for 10 s, 50°C (*CHDLOOPDIR/CHDLOOPINV*) or 55°C (*TDLOOPDIR/TDLOOPINV*, *D12SDIR/D12SINV*, and *G12SDIR/G12SINV*) for 30 s and 72°C for 1 s. Samples were then cooled to 40°C for 30 s. The same program was used to amplify each of the species-specific PCR systems, along with the positive amplification control. Unless otherwise indicated, all real-time PCR reactions were carried out in triplicate for each DNA extract.

The  $C_p$  value, which refers to the cycle number where the sample's fluorescence significantly increases above the background level, was calculated automatically by the LightCycler software as the first maximum of the second derivative of the curve. The continual measurement of fluorescence is related to the amount of amplicon in real-time PCR, yielding a qualitative result on the presence of the target species.

### Construction of Standard Curves and Data Analysis

To assess the efficiency, linear range and analytical sensitivity of the real-time PCR system, standard curves were constructed for each avian species. For chicken detection, 3 arrays of different matrix-matched reference feeds (Table 3: bones, R1–R4; carcass, R6–R10; and muscle, R12–R16) rendered under homogeneous conditions and containing increasing amounts of target material were used. Plus, 3 independent standard curves were constructed for turkey, duck, and goose systems using the laboratory-scale binary mixtures (muscle/oat) from each species. The amount of target DNA in an unknown sample can then be measured by extrapolation of the  $C_p$  value obtained in the unknown sample in the corresponding standard curve of  $C_p$  values generated from known DNA percentages of the target species. In addition, the correlation between the variables, crossing point ( $C_p$ ) and concentration ( $[ ]$ ), is semilogarithmic:

$$C_p = b \log[ ] + a,$$

where  $b$  is the slope and  $a$  is the intercept.

Linearity test, sensitivity, accuracy, and precision parameters of each species-specific real-time PCR system were evaluated according to previously described methods (Camacho et al., 1993; ICH, 2005; Bustin et al., 2009). To carry out the validation of the real-time PCR systems, 3 separate DNA extractions of each avian percentage (chicken, turkey, duck, and goose) were assayed in different days, using 3 replicates of each sample. Precision of the assay was evaluated by comparing the CV values obtained in 3 different days versus those obtained in the same day in order to assess the influence of random events (day of analysis, analyst, equipment, and so on) in the data obtained from the feed samples.

## RESULTS AND DISCUSSION

### Specificity of the Real-Time PCR

Specificity of the 4 avian real-time PCR systems was confirmed by analysis of DNA extracted from tissues of 27 animal species (mammals, fish, and birds) and 14 plant species. As can be seen in Table 1, chicken, turkey, duck, and goose real-time PCR systems positively detected their corresponding target tissues, whereas no amplification signal was obtained on the nontarget animal and plant species tested. The 18S rRNA eukaryotic system amplified DNA from all eukaryotic samples tested.

### Sensitivity and Performance of the Real-Time PCR

**Analysis of Industrial Feeds—Chicken Detection.** To determine the sensitivity of the real-time PCR assay

for chicken detection in feedstuffs, 3 arrays of reference feeds rendered at 133°C and containing different levels of target material were first analyzed with the real-time PCR system. As can be deduced from Table 3, the chicken material was successfully detected in all tested reference samples (bones: R1–R5; carcass: R6–R11, and muscle: R12–R16) treated at 133°C, even at the lowest concentration level (0.1%). However, depending on the nature of the tissue tested (bone, carcass, or muscle), highly variable PCR amplification results (expressed as  $C_p$  values) were achieved. For example, the 0.1 percentage generated a  $C_p$  of 23.23 for chicken bones (sample R1), 32.58 for chicken carcass (R6), and 41.66 for chicken muscle (R12), suggesting that bone tissue is much less affected by severe processing temperatures than muscle tissue. These observations are in line with other works that argue that survival of DNA to drastic processes is particularly manifested in bones, where the DNA molecule is stabilized by mineral sorption. Thus, specific features of the bone matrix, such as the adsorption of DNA to hydroxyapatite and the 3-dimensional packaging of the macromolecule within the bone, could have a crucial role in DNA preservation (Collins et al., 2002; Götherström et al., 2002; Fumière et al., 2009) and may explain the lower  $C_p$  values obtained in meals containing 100% bone tissue (bones) compared with meals containing muscle tissue (carcass and muscle).

Once the sensitivity criteria was achieved down to the 0.1% target level rendered at 133°C, the effectiveness and detection limit of the chicken real-time PCR was investigated in the rest of the available reference feeds (R17–R21) subjected to more severe heat treatments (137, 141, and 145°C) and containing a 0.2% target. Results obtained showed that higher rendering temperatures clearly decreased the amount of detectable DNA, compromising assay sensitivity and limiting detection in some samples (Table 3). To further evaluate the sensitivity and applicability of the chicken real-time PCR with a wider sample representation, an extensive testing was performed on a batch of 48 blind industrial feeds manufactured at temperatures ranging from 125 to 145°C and spiked with different concentrations of avian target tissues (from 0.1 to 100%). Once analyses were completed, the European laboratory provided us with the specifications on the real composition and processing treatment of the blind feed samples (Table 3), and results obtained were then interpreted.

Similar to the reference feeds, the  $C_p$  values and detection limits achieved in the blind trial varied (for equivalent amounts of target) according to the tissue and processing temperature applied to the feeds: the chicken real-time PCR system yielded a straightforward positive signal in feeds treated at 133°C, down to 0.1% target level. With respect to samples processed at 137°C, the presence of chicken was detected in all carcass feeds (even at 0.1% level), but in muscle feeds, the detection limit was 1%. Likewise, a positive detection was accomplished in all carcass feeds subjected to 141°C (0.1% detection limit), whereas in muscle feeds,

1714

PEGELS ET AL.

**Table 3.** Real-time PCR results obtained with the chicken real-time PCR system for industrial feed samples containing different levels of declared chicken content processed at temperatures from 125 to 145°C

Item	Description of industrial feed			Real-time PCR results(C <sub>p</sub> ) <sup>1</sup>	
	Target material content (%) / T (°C)	Nontarget material		C.S.S	P.A.C
Reference					
R1	0.1 chicken bones <sup>2</sup>	133	porcine protein	28.23 ± 0.06	23.01 ± 0.02
R2	0.5 chicken bones	133	porcine protein	25.91 ± 0.08	24.77 ± 0.04
R3	1 chicken bones	133	porcine protein	24.29 ± 0.05	21.97 ± 0.02
R4	2 chicken bones	133	porcine protein	23.49 ± 0.01	23.99 ± 0.04
R5	100 chicken bones	133	—	18.50 ± 0.02	20.55 ± 0.08
R6	0.1 chicken carcass <sup>3</sup>	133	porcine protein	32.58 ± 0.06	25.10 ± 0.06
R7	0.2 chicken carcass	133	porcine protein	31.50 ± 0.06	25.03 ± 0.04
R8	0.5 chicken carcass	133	porcine protein	30.56 ± 0.07	24.99 ± 0.04
R9	1 chicken carcass	133	porcine protein	28.50 ± 0.01	24.29 ± 0.05
R10	2 chicken carcass	133	porcine protein	27.62 ± 0.07	26.48 ± 0.02
R11	100 chicken carcass	133	—	21.17 ± 0.02	22.12 ± 0.01
R19	0.2 chicken carcass	137	porcine protein	33.16 ± 0.03	26.11 ± 0.06
R20	0.2 chicken carcass	141	porcine protein	42.05 ± 0.08	25.12 ± 0.00
R21	0.2 chicken carcass	145	porcine protein	ND <sup>5</sup>	25.87 ± 0.09
R12	0.1 chicken muscle <sup>4</sup>	133	porcine protein	41.66 ± 0.08	26.55 ± 0.09
R13	0.2 chicken muscle	133	porcine protein	40.26 ± 0.04	26.84 ± 0.02
R14	0.5 chicken muscle	133	porcine protein	39.22 ± 0.09	26.65 ± 0.02
R15	1 chicken muscle	133	porcine protein	37.14 ± 0.02	23.99 ± 0.08
R16	2 chicken muscle	133	porcine protein	36.20 ± 0.02	23.96 ± 0.00
R17	0.2 chicken muscle	141	porcine protein	ND	26.19 ± 0.08
R18	0.2 chicken muscle	145	porcine protein	ND	25.03 ± 0.01
Blind <sup>6</sup>					
S25	0.1 chicken carcass	133	porcine protein	32.52 ± 0.08	25.81 ± 0.07
S23	0.5 chicken carcass	133	porcine protein	30.49 ± 0.00	25.74 ± 0.04
S37	0.1 chicken carcass	137	porcine protein	33.72 ± 0.07	26.67 ± 0.07
S51	0.5 chicken carcass	137	porcine protein	32.10 ± 0.02	26.75 ± 0.04
S44	1 chicken carcass	137	porcine protein	31.51 ± 0.05	25.43 ± 0.06
S64	2 chicken carcass	137	porcine protein	29.78 ± 0.06	24.98 ± 0.01
S40	100 chicken carcass	137	—	21.98 ± 0.00	23.05 ± 0.02
S62	0.1 chicken muscle	137	porcine protein	ND	25.90 ± 0.01
S39	0.5 chicken muscle	137	porcine protein	ND	26.79 ± 0.02
S54	1 chicken muscle	137	porcine protein	42.44 ± 0.07	25.53 ± 0.01
S50	2 chicken muscle	137	porcine protein	42.62 ± 0.09	25.41 ± 0.06
S60	100 chicken muscle	137	—	36.11 ± 0.05	25.49 ± 0.09
S52	0.1 chicken carcass	141	porcine protein	42.40 ± 0.07	25.56 ± 0.01
S38	0.5 chicken carcass	141	porcine protein	38.51 ± 0.06	26.77 ± 0.09
S48	1 chicken carcass	141	porcine protein	37.85 ± 0.06	25.51 ± 0.08
S58	2 chicken carcass	141	porcine protein	36.19 ± 0.08	25.89 ± 0.05
S47	100 chicken carcass	141	—	31.27 ± 0.05	29.56 ± 0.08
S41	0.1 chicken muscle	141	porcine protein	ND	26.75 ± 0.06
S55	0.5 chicken muscle	141	porcine protein	ND	25.98 ± 0.02
S22	1 chicken muscle	141	porcine protein	42.00 ± 0.06	25.72 ± 0.05
S46	2 chicken muscle	141	porcine protein	40.74 ± 0.07	23.45 ± 0.07
S56	100 chicken muscle	141	—	37.25 ± 0.07	31.92 ± 0.02
S43	0.1 chicken carcass	145	porcine protein	ND	24.33 ± 0.07
S57	0.5 chicken carcass	145	porcine protein	ND	24.67 ± 0.05
S53	1 chicken carcass	145	porcine protein	ND	26.56 ± 0.07
S45	2 chicken carcass	145	porcine protein	ND	25.99 ± 0.03
S59	100 chicken carcass	145	—	39.48 ± 0.04	30.67 ± 0.03
S42	0.1 chicken muscle	145	porcine protein	ND	27.79 ± 0.01
S63	0.2 chicken muscle	145	porcine protein	ND	27.79 ± 0.03
S17	1 chicken muscle	145	porcine protein	ND	27.99 ± 0.05
S61	2 chicken muscle	145	porcine protein	ND	26.87 ± 0.02
S49	100 chicken muscle	145	—	38.79 ± 0.01	32.41 ± 0.04
S18	100 hydrolysed feather meal	125	—	28.13 ± 0.01	30.46 ± 0.05
S65	100 poultry meal standard	133	—	15.39 ± 0.00	19.87 ± 0.01
S66	100 poultry MBM <sup>7</sup>	133	—	11.72 ± 0.01	19.01 ± 0.02
S15	1 chicken intestines + bones	133	pig feed	28.08 ± 0.04	13.13 ± 0.06
S13	2 chicken intestines + bones	133	pork intestines + bones	28.17 ± 0.02	19.81 ± 0.06
S12	5 chicken intestines + bones	133	pork intestines + bones	23.73 ± 0.00	19.75 ± 0.07
S16	5 chicken intestines + bones	133	pig feed	23.73 ± 0.00	13.98 ± 0.01

*Continued*

the threshold was situated in 1%. It should be noted, however, that very high C<sub>p</sub> (>40) were achieved in some of the chicken percentages detected at 137 and 141°C, which is evidence of the higher level of DNA

degradation at these temperatures. Concerning chicken PAP detection at the highest temperature tested (145°C), only samples containing 100% target (carcass and muscle) gave a positive PCR signal (Table 3). In



**Table 3 (Continued).** Real-time PCR results obtained with the chicken real-time PCR system for industrial feed samples containing different levels of declared chicken content processed at temperatures from 125 to 145°C

Item	Description of industrial feed				Real-time PCR results( $C_p$ ) <sup>1</sup>	
	Target material content (%) / T (°C)		Nontarget material		C.S.S	P.A.C
S11	100	chicken intestines + bones	133	—	18.75 ± 0.04	18.79 ± 0.07
S67	100	chicken intestines + MBM	133	—	19.50 ± 0.01	19.35 ± 0.02
S68	100	chicken intestines	133	—	20.30 ± 0.04	19.03 ± 0.03
S69	100	chicken intestines	137	—	22.86 ± 0.06	23.01 ± 0.08

<sup>1</sup>Average crossing point ( $C_p$ ) value ± SD shown from triplicate PCR reactions from each DNA extraction. C.S.S: chicken-specific system on the D-loop gene (*CHDLOOPDIR/CHDLOOPINV* and *CHDLOOPP*); P.A.C: positive amplification control (*18SDIR/18SINV* and *18SP*) on the 18S rRNA gene.

<sup>2</sup>Bones: 100% bones from heads and shanks.

<sup>3</sup>Carcass: 50% bone, 20% muscle, 20% fatty tissue, and 10% connective tissue/blood.

<sup>4</sup>Muscle: 100% muscle, blood (in muscle), and a trace of fat.

<sup>5</sup>ND: not detected chicken samples (no positive signal after 50 PCR cycles).

<sup>6</sup>Blind samples (only feeds containing declared chicken material are reflected in the table). All the samples were provided by the Co-operative Central Laboratory (CCL-Nutricontrol; the Netherlands) and have been rearranged in the table according to temperature, matrix, and target percentage characteristics.

<sup>7</sup>MBM: meat and bone meal.

line with the previous observations, it can be concluded that depending on the tissue present in the feed, as rendering temperatures increase above those normally employed for the feed production process (133°C), the  $C_p$  will be higher and a threshold will be reached above which detection of PAP in feeds may be unattainable (i.e. not-detected samples shown in Table 3). However, this shortcoming is rather theoretical, because economic (energy costs) and nutritional (destruction of some amino acids) reasons prevent renderers from greatly exceeding the minimum legal requirements for sterilization temperature (133°C). Furthermore, pressure security limits of most existing sterilization devices are such that temperatures above 133°C are confined to a small number of plants (Gizzi et al., 2003). The obtained results agree with other studies reporting the influence of aggressive sterilization treatments in PCR sensitivity when attempting detection of PAP in industrial feeds rendered at different temperatures up to 141°C (Chiapini et al., 2005; Fumière et al., 2006). However, these works are focused on species other than poultry (mainly ruminants). Thus, one of the major achievements of this work is represented by the wide assortment of avian PAP analyzed that undergo different industrial rendering processes conform to European regulations, including feed samples treated at extreme temperatures (up to 145°C). This adds significant value to the work, especially when compared with other PCR-based assays targeting chicken or poultry (mainly chicken and turkey) sequences that use laboratory-scale prepared samples that do not reproduce the rendering processes of commercial feeds (Dalmasso et al., 2004; Bellagamba et al., 2006; Yancy et al., 2009). Moreover, an effort toward oligonucleotide design on very short fragments as described in this work is crucial to allow PCR detection on feeds harboring highly damaged DNA (samples treated up to 145°C).

In agreement with the composition data of the industrial feeds, no chicken-positive PCR signal was gener-

ated in 5 out of 48 blind samples which contained PAP of porcine, bovine, or ovine origin but were declared free from avian content (results not shown), meeting the desired specificity requirements. All the feeds amplified successfully with the 18S rRNA eukaryotic system. The use of the positive amplification control offers an indicator of the total PCR-amplifiable eukaryotic DNA present in the samples, being important to assure no false-negative results due to the presence of PCR inhibitors in feed matrices or DNA extraction reagents.

**Turkey, Duck, and Goose Detection.** Reference experimental binary mixtures (muscle/oat) from turkey, duck, and goose containing 0.1, 1, 5, and 100% PAP were first analyzed with each corresponding avian-specific real-time PCR system. As already mentioned, laboratory-scale prepared samples were used at this point because turkey, duck, and goose reference materials were not available from the European laboratories that supplied the samples. Results showed successful detection of the full range of reference samples tested, even at the lowest concentration levels assayed (0.1%; Table 4).

Subsequent to the analysis of the reference samples, the batch of 48 blind feeds previously tested for chicken detection was screened with the turkey, duck, and goose real-time PCR systems to assess the possible presence of PAP from these avian species in the industrial feeds. Results obtained indicated the presence of turkey tissues in 3 blind samples (S18, S65, and S66; Table 3). Contrarily, none of the blind industrial feeds gave a positive PCR signal for either duck or goose content, in consonance with the information provided by the European laboratories reflecting the unavailability of by-product materials from these species. The 18S rRNA system run simultaneously to each avian PCR, amplified the DNA in all samples tested. Despite the fact that turkey, goose, and duck reference feeds are sensitively detected (down to 0.1% level) with their corresponding real-time PCR systems, the laboratory-

1716

PEGELS ET AL.

**Table 4.** Real-time PCR results obtained with the turkey, duck, and goose real-time PCR systems for feeds containing different levels of declared target content

Item	Description of sample				Real-time PCR result ( $C_p$ ) <sup>1</sup>			
	Target material content (%) / T (°C)		Matrix		T.S.S	D.S.S	G.S.S	P.A.C
Reference								
T1	0.1	turkey muscle	133	oat	26.85 ± 0.03	— <sup>2</sup>	—	10.08 ± 0.02
T2	1	turkey muscle	133	oat	23.67 ± 0.01	—	—	10.33 ± 0.01
T3	5	turkey muscle	133	oat	21.45 ± 0.02	—	—	10.56 ± 0.00
T4	100	turkey muscle	133	oat	17.23 ± 0.00	—	—	12.45 ± 0.01
D1	0.1	duck muscle	133	oat	—	26.90 ± 0.05	—	10.03 ± 0.09
D2	1	duck muscle	133	oat	—	24.97 ± 0.03	—	10.34 ± 0.02
D3	5	duck muscle	133	oat	—	22.75 ± 0.01	—	10.04 ± 0.01
D4	100	duck muscle	133	oat	—	17.74 ± 0.02	—	12.11 ± 0.01
G1	0.1	goose muscle	133	oat	—	—	30.76 ± 0.09	10.33 ± 0.03
G2	1	goose muscle	133	oat	—	—	27.34 ± 0.02	10.07 ± 0.07
G3	5	goose muscle	133	oat	—	—	25.25 ± 0.08	10.04 ± 0.01
G4	100	goose muscle	133	oat	—	—	21.22 ± 0.01	13.00 ± 0.01
Blind <sup>3</sup>								
S18	100	hydrolyzed feather meal	125		29.83 ± 0.04	—	—	32.09 ± 0.00
S65	100	poultry meal standard	133		20.81 ± 0.01	—	—	22.01 ± 0.04
S66	100	poultry MBM	133		20.11 ± 0.03	—	—	19.98 ± 0.00

<sup>1</sup>Average crossing point ( $C_p$ ) value ± SD shown from triplicate PCR reactions from each DNA extraction. Similar  $C_p$  values are generated at 50°C (chicken system). T.S.S: turkey-specific system on the D-loop gene (*TDLOOPDIR/TDLOOPINV* and *TDLOOPP*); D.S.S: duck-specific system on the 12S rRNA gene (*D12SDIR/D12SINV* and *D12SP*); G.S.S: goose-specific system on the 12S rRNA gene (*G12SDIR/G12SINV* and *G12SP*); P.A.C: positive amplification control (18SDIR/18SINV and 18SP) on the 18S rRNA gene at 55°C (turkey, duck, and goose systems).

<sup>2</sup>Dash indicates no positive signal after 50 PCR cycles.

<sup>3</sup>Blind samples (only samples containing declared target material are reflected in the table). Reference samples were manufactured by the Department of Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos (Spain).

scale autoclaving treatment applied to these samples cannot be considered analogous to the EU procedures for the rendering of animal products. Thus, availability of samples representative of real world feed ingredients containing PAP from these avian species would be necessary to ascertain the performance of the real-time PCR method.

Although there are published works describing detection of chicken or poultry in feedstuffs by means of conventional or real-time PCR assays (Bottero et al., 2003; Dalmasso et al., 2004; Bellagamba et al., 2006; Frezza et al., 2008; Cawthraw et al., 2009; Yancy et al., 2009), much less attention is paid to the specific identification of avian species such as turkey, duck, and goose (Martín et al., 2007). In this respect, availability of effective species-specific PCR assays to identify any animal species present in feedstuffs will be imperative when nonruminant meat and bone meal is once again authorized in feed, considering prevention of cannibalism (ban on intraspecies recycling; European Commission, 2009b). To our knowledge, this is the first report of the possibility of detecting turkey, duck, and goose in feedstuffs by means of a species-specific real-time PCR approach.

### Quantitative Capability of the Assay

To assess the quantification ability of the assay, PCR amplification efficiency and correlation coefficient  $R^2$  of each real-time PCR system (chicken, turkey, duck, or goose) was calculated from a regression line of  $C_p$  values obtained from reference feeds containing increasing amounts of the corresponding target concentration and

subjected to identical temperature processing (133°C; Figure 1). As shown in the figure, the resulting theoretical slopes of the chicken (Figure 1A,B,C), turkey (1D), duck (1E), and goose (1F) standard curves showed values near to the slope's value of  $-3.32$ , corresponding to a 100% PCR efficiency in each cycle. However, results showed a marked variability of the chicken system PCR efficiency depending on the matrix considered (bone, carcass, and muscle, Figures 1A,B,C, respectively), supporting the previously described findings regarding the influence of tissue type on PCR efficiency.

Linearity of the chicken, turkey, duck, and goose real-time PCR response was also analyzed. In each PCR system, the following parameters were evaluated: (a) Cochran's test, which determined whether the variances of the responses obtained for each concentration of the target DNA in the reference feeds were homogeneous, (b) regression analysis, and (c) variance analysis with lack of fit. All parameters were evaluated following previously described validation protocols (Figure 1; Camacho et al., 1993; ICH, 2005; Bustin et al., 2009). The accuracy of the assay was determined from the 4 percentages of reference samples from each species (chicken, turkey, duck, and goose). Accuracy is reported as percentage recovery by the assay of known added amounts of analyte. Using the Snedecor F-test, it was verified that the concentration of DNA present in a sample did not affect the variation of the results. The values for Student's  $t$ -test obtained demonstrated that the method was accurate, given that no significant differences between 100% and the mean recovery values were detected. The repeatability (short-term precision) of the assay was determined based upon the standard



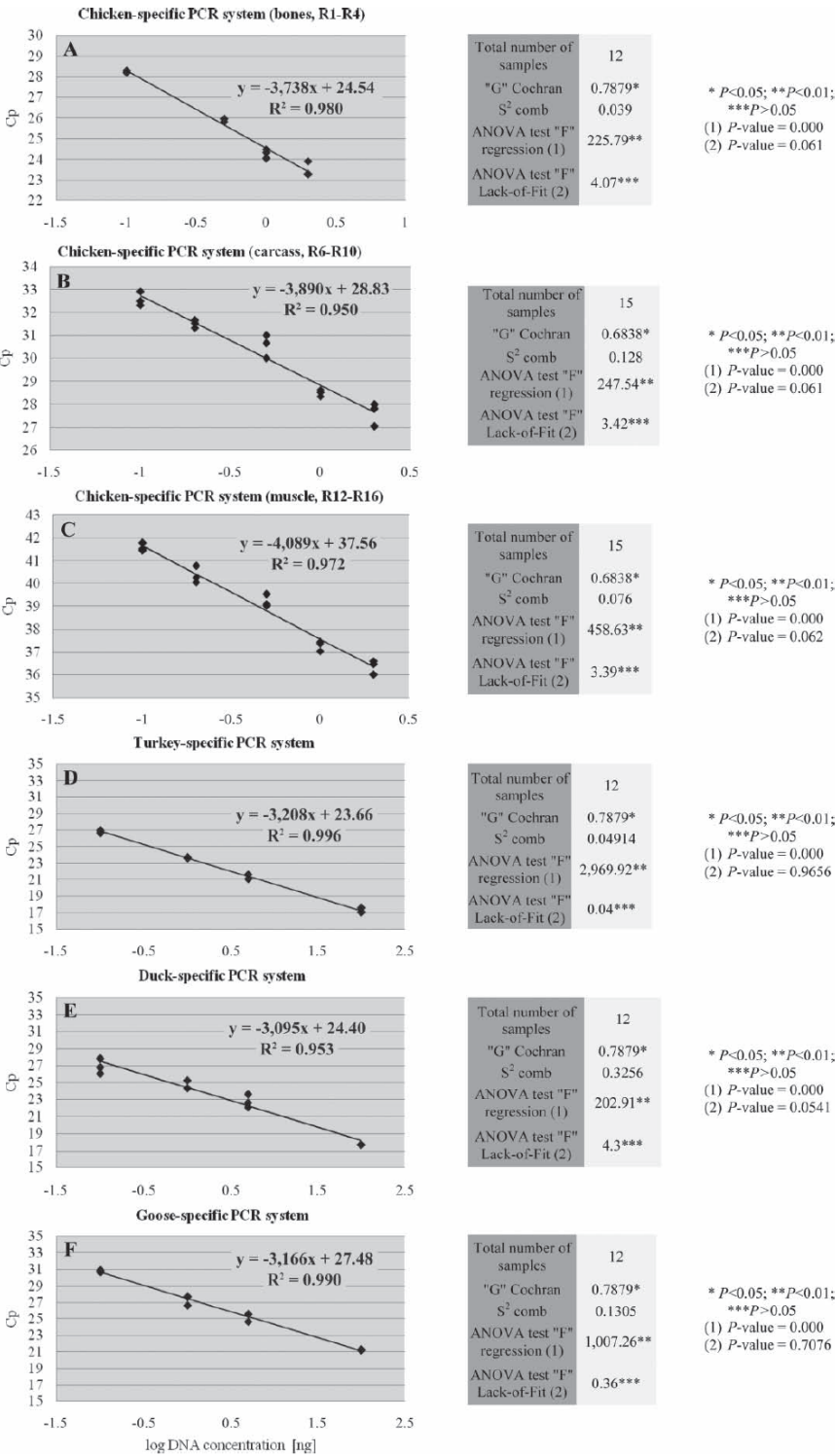


Figure 1. Crossing point ( $C_p$ ) values obtained from chicken (A, B, and C), turkey (D), duck (E), and goose (F) reference samples, plotted versus the logarithm of the DNA concentrations. Linearity test, regression line, and sensitivity parameters are calculated for each species-specific PCR system.

deviation in  $C_p$  values generated from 3 replicates of the reference feeds analyzed in the same run. The results indicated that  $C_p$  values have an acceptable level of repeatability over all magnitudes of target DNA concentrations. The influence of day of analysis on the precision of the assay (long-term precision) was also tested by comparing the CV of 3 separate DNA extractions performed on the 0.1% chicken, turkey, duck, and goose reference feeds, analyzed in triplicate 3 times on the same day, versus the values obtained for the same samples on 3 different days. Results showed significant differences with higher CV values when the assay was done on different days with respect to the same day. Thus, a standard curve should be determined on each day of analysis.

These results indicate that the real-time PCR technique developed has the quantitative potential for detection of avian PAP in feeds, given the positive correlation between fluorescence values and target DNA concentration in all the avian PCR systems studied. However, when applied to routine analyses of blind (unknown) feeds, the heterogeneous tissue-types and ingredients that can be present, together with the different processing treatments applied to the samples, may lead to measurement and quantification uncertainty of the real-time PCR method. As a consequence, a given blind feed containing a high proportion of banned animal material and treated at temperatures higher than 133°C (e.g., sample S47, 141°C) can be misidentified as another feed containing a lower amount of target but treated at a lower temperature (e.g., sample S25, 133°C). Under a practical perspective, this confusion could be problematic if the European Food Safety Authority decides to adopt certain tolerance levels for the presence of small quantities of nonruminant PAP in animal feed as a result of accidental cross-contamination along the feed production chain.

Considering all the previous aspects, quantification of PAP in feedstuffs would only be usable when a defined set of samples with identical features in terms of composition and processing are available for the preparation of suitable calibration standards. This is not feasible in case of a routine application of the real-time PCR to feedstuff analysis, because these characteristics are unknown, and therefore only qualitative analysis can be achieved.

In summary, the real-time PCR developed allows sensitive detection of chicken, turkey, duck, and goose material in feedstuffs. However, real-time PCR performance is highly influenced by the processing temperature applied to the feeds and the type of tissue tested, hampering reliable quantification of the target content in feeds. Even when not applied for quantitative purposes, this method is useful for the qualitative detection of minute amounts of avian prohibited material in animal feeds, making it a reliable and useful diagnostic tool to enforce BSE control measures.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors are indebted to R. Margry from CCL-Nutricontrol (the Netherlands) for kindly providing us with the industrial feed samples analyzed in this study. This work was supported by the Programa de Vigilancia Sanitaria 2009/AGR/1489 of the Comunidad de Madrid (Spain) and by a project (AGL2010/15279) from the Ministerio de Ciencia e Innovación (Spain). Nicolette Pegels is recipient of a fellowship from the Ministerio de Educación (Spain).

## REFERENCES

- Ansfield, M., S. Reaney, and R. Jackman. 2000. Production of a sensitive immunoassay for detection of ruminant and porcine proteins, heated to >130°C at 2.7 bar, in compound animal feedstuffs. *Food Agric. Immunol.* 12:337–348.
- Baeten, V., C. von Holst, A. Garrido, J. Vancutsem, A. Michotte Renier, and P. Dardenne. 2005. Detection of banned meat and bone meal in feedstuffs by near infrared microscopic analysis of the dense sediment fraction. *Anal. Bioanal. Chem.* 382:149–157.
- Bellagamba, F., S. Comincini, L. Ferretti, F. Valfre, and V. M. Moretti. 2006. Application of quantitative real-time PCR in the detection of prion-protein gene species-specific DNA sequences in animal meals and feedstuffs. *J. Food Prot.* 69:891–896.
- Bellagamba, F., F. Valfre, S. Panseri, and V. M. Moretti. 2003. Polymerase chain reaction-based analysis to detect terrestrial animal protein in fish meal. *J. Food Prot.* 66:682–685.
- Bottero, M. T., A. Dalmasso, D. Nucera, R. M. Turi, S. Rosati, S. Squadrone, M. Goria, and T. Civera. 2003. Development of a PCR assay for the detection of animal tissues in ruminant feeds. *J. Food Prot.* 66:2307–2312.
- Burns, M. J., G. J. Nixon, C. A. Foy, and N. Harris. 2005. Standardization of data from real-time quantitative PCR methods—Evaluation of outliers and comparison of calibration curves. *BMC Biotechnol.* 5:31.
- Bustin, S. A., V. Benes, J. A. Garson, J. Hellemans, J. Huggett, M. Kubista, R. Mueller, T. Nolan, M. W. Pfaffl, G. L. Shipley, J. Vandesompele, and C. T. Wittwer. 2009. The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin. Chem.* 55:611–622.
- Camacho, M. A., A. I. Torres, M. E. Gil-Alegre, M. M. Obregón, and V. Ruz. 1993. Validation protocol of analytical methods for finished pharmaceutical products. *STP Pharma Pratiques* 3:197–202.
- Cawthraw, S., G. C. Saunders, T. C. Martin, J. Sawyer, O. Windl, and S. D. Readney. 2009. Real-time PCR detection and identification of prohibited mammalian and avian material in animal feeds. *J. Food Prot.* 72:1055–1062.
- Chiappini, B., G. Brambilla, U. Agrimi, G. Vaccari, H. J. M. Aarts, G. Berben, D. Frezza, and V. Giambra. 2005. Real-time PCR approach for quantitation ruminant-specific DNA to indicate a correlation between DNA amount and meat and bone meal heat treatments. *J. AOAC Int.* 88:1399–1403.
- Collins, M. J., C. M. Nielsen-Marsh, J. Hiller, C. I. Smith, J. P. Roberts, R. V. Prigodich, T. J. Wess, J. Csapò, A. R. Millard, and G. Turner-Walker. 2002. The survival of organic matter in bone: A review. *Archaeometry* 44:383–394.
- Dalmasso, A., E. Fontanella, P. Piatti, T. Civera, S. Rosati, and M. T. Bottero. 2004. A multiplex PCR assay for the identification of animal species in feedstuffs. *Mol. Cell. Probes* 18:81–87.
- EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). 2011. Scientific opinion on the revision of the quantitative risk assessment (QRA) of the BSE risk posed by processed animal proteins (PAPs). *EFSA J.* 9:1947.
- European Commission. 1994. Commission Decision 1994/381/EC of 27 June 1994 concerning certain protection measures with regard to bovine spongiform encephalopathy and the feeding of mamma-

- lian derived protein. Official Journal of European Communities L172:23–24.
- European Commission. 2003. Commission Regulation 2003/1234/EC of 10 July 2003 amending annexes I, IV and XI to Regulation 2001/999/EC of the European Parliament and of the Council and Regulation 2000/11326/EC as regards transmissible spongiform encephalopathies and animal feeding. Off. J. Eur. Comm. L173:6–13.
- European Commission. 2009a. Commission Regulation 2009/152/EC of 27 January 2009 laying down the methods of sampling and analysis for the official control of feed. Off. J. Eur. Comm. L54:1–130.
- European Commission. 2009b. Commission Regulation 2009/1069/EC of 21 October 2009 laying down health rules as regards animal by-products and derived products not intended for human consumption and repealing Regulation (EC) No 1774/2002 (Animal by-products Regulation). Official Journal of European Communities L300:1–33.
- Frezza, D., M. Favaro, G. Vaccari, C. Von Holst, V. Giambra, E. Anklam, D. Bove, P. A. Battaglia, U. Agrimi, G. Brambilla, P. Ajmone-Marsan, and M. Tartaglia. 2003. A competitive polymerase chain reaction-based approach for the identification and semiquantification of mitochondrial DNA in differently heat-treated bovine meat and bone meal. *J. Food Prot.* 66:103–109.
- Frezza, D., V. Giambra, F. Chegdani, C. Fontana, G. Maccabiani, N. Losio, E. Faggionato, B. Chiappini, G. Vaccari, C. von Holst, L. Lanni, S. Saccare, and P. Ajmone-Marsan. 2008. Standard and Light-Cycler PCR methods for animal DNA species detection in animal feedstuffs. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 9:18–23.
- Fumière, O., M. Dubois, V. Baeten, C. von Holst, and G. Berben. 2006. Effective PCR detection of animal species in highly processed animal byproducts and compound feeds. *Anal. Bioanal. Chem.* 385:1045–1054.
- Fumière, O., P. Veys, A. Boix, C. von Holst, V. Baeten, and G. Berben. 2009. Methods of detection, species identification and quantification of processed animal proteins in feedingstuffs. *Bio-technol. Agron. Soc. Environ.* 13:59–70.
- Gizzi, G., L. W. D. van Raamsdonk, V. Baeten, I. Murray, G. Berben, G. Brambilla, and C. von Holst. 2003. An overview of tests for animal tissues in feeds applied in response to public health concerns regarding bovine spongiform encephalopathy. *Rev. Off. Int. Epizoot.* 22:311–331.
- Götherström, A., M. J. Collins, A. Angerbjörn, and K. Lidén. 2002. Bone preservation and DNA amplification. *Archaeometry* 44:395–404.
- ICH (International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use). 2005. Harmonised tripartite guideline. Validation of analytical procedures: Text and methodology Q2 (R1). Accessed Oct. 2011. [http://www.ich.org/fileadmin/Public\\_Web\\_Site/ICH\\_Products/Guidelines/Quality/Q2\\_R1/Step4/Q2\\_R1\\_Guideline.pdf](http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1_Guideline.pdf).
- Kremár, P., and E. Rencová. 2005. Quantitative detection of species-specific DNA in feedstuffs and fish meals. *J. Food Prot.* 68:1217–1221.
- Martín, I., T. García, V. Fajardo, I. López-Calleja, M. Rojas, M. A. Pavón, P. E. Hernández, I. González, and R. Martín. 2007. Detection of chicken, turkey, duck, and goose tissues in feedstuffs using species-specific polymerase chain reaction. *J. Anim. Sci.* 85:452–458.
- Momcilovic, D., and A. Rasooly. 2000. Detection and analysis of animal materials in food and feed. *J. Food Prot.* 63:1602–1609.
- Oluwinka, O., and A. Olayiwola. 2009. Meat and bone meal good energy source for swine. *Render* June:10–12.
- Pascoal, A., M. Prado, J. Castro, A. Cepeda, and J. Barros-Velázquez. 2004. Survey of authenticity of meat species in food products subjected to different technological processes, by means of PCR RFLP analysis. *Eur. Food Res. Technol.* 218:306–312.
- Woodgate, S. L., S. van den Hoven, J. Vaessen, and R. Margry. 2009. Control tools to detect processed animal proteins in feed and in animal by-products: Specificity and challenges. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 13:9–13.
- Yancy, H. F., J. D. Washington, L. Callahan, J. A. Mason, C. M. Deaver, D. E. Farrell, T. Ha, E. Sespico, D. Falmlen, and M. J. Myers. 2009. Development, evaluation, and peer verification of a rapid real-time PCR method for the detection of animal material. *J. Food Prot.* 72:2368–2374.



## Analytical Methods

## Avian-specific real-time PCR assay for authenticity control in farm animal feeds and pet foods



Nicolette Pegels, Isabel González\*, Teresa García, Rosario Martín

Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 11 April 2012

Received in revised form 16 November 2012

Accepted 7 July 2013

Available online 15 July 2013

## Keywords:

TaqMan real-time PCR

12S rRNA gene

Avian

Farm animal feeds

Pet feeds

Traceability

## ABSTRACT

A highly sensitive TaqMan real-time PCR assay targeting the mitochondrial 12S rRNA gene was developed for detection of an avian-specific DNA fragment (68 bp) in farm animal and pet feeds. The specificity of the assay was verified against a wide representation of animal and plant species. Applicability assessment of the avian real-time PCR was conducted through representative analysis of two types of compound feeds: industrial farm animal feeds ( $n = 60$ ) subjected to extreme temperatures, and commercial dog and cat feeds ( $n = 210$ ). Results obtained demonstrated the suitability of the real-time PCR assay to detect the presence of low percentages of highly processed avian material in the feed samples analysed. Although quantification results were well reproducible under the experimental conditions tested, an accurate estimation of the target content in feeds is impossible in practice. Nevertheless, the method may be useful as an alternative tool for traceability purposes within the framework of feed control.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## 1. Introduction

The compound feed industry consists of two distinct sectors: farm animal feeds and pet foods. Within these sectors, authenticity and related correct product labelling are essential issues to prevent frauds and to avoid potential safety risks caused by the introduction of any food ingredient that might be harmful to human and/or animal health (Casazza, Gavazzi, Mastromauro, Gianì, & Breviaro, 2011; Pascoal et al., 2011). A relevant example of this is the public health crisis caused by the bovine spongiform encephalopathy (BSE) disease, which was linked to the consumption of animal feed contaminated by infected ruminant proteins. To restore consumer's confidence, a total ban on the feeding of processed animal proteins (PAPs) to all farmed animals (with limited exceptions), was enacted since January 2001 (Regulation 999/2001/EC). Although the ban is still in place, a partial amendment is being under debate by European authorities during the last few years towards the re-entry of certain non-ruminant proteins (i.e. pig and poultry proteins) into feed for mono-gastric animals, assuming that the transmission risk of BSE from non-ruminants to non-ruminants is "very unlikely" (EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ), 2011). A related concern of European authorities regarding traceability of feed materials is that affecting the use of animal by-products for manufacturing pet foods. Nowadays, dog and/or cat owners often do not have the time, money and resources to

devote to preparing fresh wholesome meals for their pets, thus relying upon the use of the different kinds of processed food available in the market (Kang & Kondo, 2002). To comply with legislation, pet food labels must indicate either all the ingredients present in the product or the categories to which the ingredients belong, and should be transparent, consistent, coherent and understandable (Regulation 767/2009/EC).

In spite of the existence of mandatory traceability requirements for farm animal and pet feeds, labels do not provide sufficient guarantee about the real species and nutrient composition of a product. These limitations highlight the need for reliable analytical techniques to enforce the legislative frame and allow the authentication of animal feedstuffs (Chiappini et al., 2005; Goffaux, China, Dams, Clinquart, & Daube, 2005). Techniques based on the analysis of the molecular components of cells, either proteins or DNA, are widely applied for species identification in food for human and animal consumption. However, their performances are dependent on processing conditions used at manufacture and the heterogeneous composition of the materials under study (Frezza et al., 2003; Momcilovic & Rasooly, 2000). Protein-based methods, such as immunoassays, are limited since the targets of detection are denatured proteins. Consequently, species identification will not be optimal in matrices subjected to food processing procedures involving severe heat treatments (Bottero & Dalmaso, 2011). Conversely, DNA is an extremely stable molecule that can be recovered from biological material that has been under stress conditions, like processed feedstuffs. Moreover, DNA is found in the majority of tissues of an organism and can provide more information than proteins due to the degeneracy of the genetic code and the presence of

\* Corresponding author. Tel.: +34 913943751; fax: +34 913943743.

E-mail addresses: [npegels@vet.ucm.es](mailto:npegels@vet.ucm.es) (N. Pegels), [gonzalzi@vet.ucm.es](mailto:gonzalzi@vet.ucm.es) (I. González), [tgarcia@vet.ucm.es](mailto:tgarcia@vet.ucm.es) (T. García), [rmartins@vet.ucm.es](mailto:rmartins@vet.ucm.es) (R. Martín).

large non-coding regions (Lockley & Bardsley, 2000; Pereira, Carneiro, & Amorim, 2008).

In the last decade, a variety of reliable and specific DNA-based methods have been developed for food and feed species authentication (Bottero & Dalmaso, 2011; Fumière et al., 2009). Amplification of specific DNA sequences by means of the polymerase chain reaction (PCR) is presently the most widely used genetic approach for species assignment in feeds (Fumière et al., 2009). Among PCR-dependant approaches, real-time PCR is based on the detection of fluorescence produced after the accumulation of PCR products with each cycle of amplification. The ability of measuring the reaction kinetics in the early phases of PCR provides a distinct advantage over other PCR methods, providing the analyses with automation, large-scale processing and quantitative potential (Dalmaso, Civera, la Neve, & Bottero, 2011; Prado et al., 2007). Real-time PCR data can be obtained using a number of different chemistries, mainly TaqMan and SYBR Green technology. In a TaqMan assay, a probe is used that specifically binds to the target amplicon. Thus, an increased specificity is achieved relative to a normal two-primer PCR or non-specific binding dyes such as SYBR Green (Ballin, Finn, Vogensen, & Karlsson, 2009; Lockley & Bardsley, 2000).

The objective of the present work was to develop a TaqMan real-time PCR method for selectively detect avian DNA in feeds for farm animals and pets, targeting short mitochondrial 12S rRNA gene sequences specific to the avian-class. The applicability of the assay was evaluated through the analysis of a wide representation of industrial farm animal feeds subjected to extreme temperatures (up to 145 °C), plus an extensive batch of commercially processed pet food products.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Sample selection

Authentic samples from a wide range of animal and plant species from different origins were included in the assays for specificity control purposes. Samples were obtained from several local abattoirs and retail markets (Madrid, Spain). Target avian samples consisted of muscle tissues from various species belonging to the anseriformes, galliformes and struthiformes orders (chicken, turkey, quail, pheasant, partridge, guinea fowl, duck, goose and ostrich, Table 1).

Farm animal feed test materials used in the present study were provided by the Co-operative Central Laboratory "CCL-Nutricontrol" (Veghel, The Netherlands) and consisted of 60 industrial PAPs containing concentrations from 0% to 100% of different avian tissues: bones, carcase, muscle, feather and intestines. Feeds were produced under strict controlled and recorded processing conditions. Avian material was treated at 125, 133, 137, 141 and 145 °C during 20 min, at hyperbaric pressure (Table 2).

In addition, a total of 210 commercial cat and dog food products of distinct brands and characteristics were purchased from several retail markets (Table 3).

### 2.2. DNA extraction

Genomic DNA was obtained from 200 mg of each sample using the Wizard DNA Clean-up System kit (Promega, Madison) as described by Pegels et al. (2011). The DNA was eluted in 100 µL of sterile deionised water and its concentration and quality was measured by at 260 and 280 nm wavelengths using a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies Inc., Montchanin, USA). Unless otherwise stated, three DNA replicates were ex-

tracted from each sample. A negative control sample was included in every DNA extraction.

### 2.3. Primers and probes design

Mitochondrial 12S rRNA gene sequences from various animal species available in the NCBI (National Center for Biotechnology Information) database were aligned with the EMMA programme included in the EMBOSS software package version 2.0. After sequence comparison and analysis, an avian-specific primer pair was designed for the selective amplification of a 66–69 bp DNA fragment common to the aligned avian species (Fig. 1), which were selected on the basis of their possible use in animal feed preparation and on DNA sequence availability. The primers were *A12SDIR*: 5'-CAGTGAGCTCAATAGCMCC-3' and *A12SINV*: 5'-CCCATTCTYC-CACCY-3'. Degenerate oligonucleotides were introduced along primer sequences in order to potentially detect all the avian species considered without affecting assay specificity. A TaqMan probe, *A12SP*: 5'-6FAM-GATATGGA + ACT + G + G + ACAGAA -BBQ-3' was designed to anneal within the gene fragment generated by amplification of the corresponding avian target. Besides, a conserved 18S rRNA primers/probe system previously reported by Pegels et al. (2011) was used as positive amplification control of the assay. Symbols (+) along the oligonucleotide sequences denote LNAs (locked nucleic acid bases) which were needed for optimal probe hybridisation. Primer Express 2.0 software (Perkin-Elmer/Applied Biosystems Division, Foster City, CA) was used to help on the primer design. TaqMan probes were designed and synthesised by Tib-MolBiol (Berlin, Germany).

### 2.4. Real-time PCR amplification

Real-time PCR was run under generic cycling conditions. The optimum PCR concentrations of primers yielding the highest end-point fluorescence and the lowest crossing point ( $C_p$ ) value were 900 nM for each forward and reverse primer. The PCR reactions were carried out using the LightCycler TaqMan Master (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany), 2 pmol of each TaqMan probe (TibMolBiol), and 2 µL of extracted DNA. Amplification reactions were performed in a total reaction volume of 10 µL in a glass capillary tube and were run on the LightCycler 2.0 Instrument (Roche Applied Science, Penzberg, Germany) with the following programme: 10 min at 95 °C, an amplification programme of 45 cycles at 95 °C for 10 s, 53 °C for 30 s, and 72 °C for 1 s. Samples were finally cooled to 40 °C for 30 s. This programme was used to amplify the avian-specific system together with the positive amplification control. Unless otherwise indicated, all real-time PCR reactions were carried out in triplicate for each DNA extract.

The  $C_p$  value, which refers to the cycle number where the sample's fluorescence significantly increases above the background level, was calculated automatically by the LightCycler software as the first maximum of the second derivative of the curve.

### 2.5. Construction of the standard curve

To assess the efficiency, linear range and analytical sensitivity of the avian real-time PCR system, two sets of the reference industrial animal feeds (Table 2: bones, R1–R4; carcase, R6–R10) rendered under homogeneous conditions (133 °C) and containing increasing amounts of the target material were used to construct separate standard curves. The amount of target DNA in an unknown sample can be then measured by extrapolation of the  $C_p$  value obtained in the unknown sample in the corresponding standard curve of  $C_p$  values generated from known DNA percentages of the target species. In addition, the correlation between the variables,  $C_p$  and concentration ( $[ ]$ ) is semilogarithmic:



**Table 1**  
Specificity of the avian real-time PCR system.

Class	Common name	Order	Species	12S rRNA A.S.S	18S rRNA P.A.C
Aves	Chicken	Galliformes	<i>Gallus gallus</i>	13.54 ± 0.01 <sup>a</sup>	13.28 ± 0.06
	Turkey	Galliformes	<i>Meleagris gallopavo</i>	11.28 ± 0.04	10.35 ± 0.00
	Quail	Galliformes	<i>Coturnix coturnix</i>	16.98 ± 0.02	10.38 ± 0.03
	Pheasant	Galliformes	<i>Phasianus colchicus</i>	16.14 ± 0.00	12.77 ± 0.01
	Partridge	Galliformes	<i>Alectoris chukar</i>	15.67 ± 0.08	10.38 ± 0.08
	Guinea fowl	Galliformes	<i>Numida meleagris</i>	10.13 ± 0.03	12.67 ± 0.05
	Duck	Anseriformes	<i>Anas platyrhynchos</i> × <i>Cairina moschata</i>	14.86 ± 0.04	12.59 ± 0.01
	Goose	Anseriformes	<i>Anser anser</i>	13.73 ± 0.01	12.85 ± 0.07
	Ostrich	Struthioniformes	<i>Struthio camelus</i>	17.16 ± 0.01	11.48 ± 0.01
Mammalia	Cattle	Ruminantia	<i>Bos taurus</i>	–	10.14 ± 0.04
	Sheep	Ruminantia	<i>Ovis aries</i>	–	10.61 ± 0.09
	Goat	Ruminantia	<i>Capra hircus</i>	–	12.25 ± 0.05
	Red deer	Ruminantia	<i>Cervus elaphus</i>	–	10.69 ± 0.02
	Roe deer	Ruminantia	<i>Capreolus capreolus</i>	–	11.26 ± 0.01
	Fallow deer	Ruminantia	<i>Dama dama</i>	–	13.15 ± 0.06
	Swine	Artiodactyla	<i>Sus scrofa domestica</i>	–	12.21 ± 0.02
	Horse	Artiodactyla	<i>Equus caballus</i>	–	12.74 ± 0.01
	Rabbit	Lagomorpha	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	–	13.32 ± 0.02
	Cat	Carnivora	<i>Felis catus</i>	–	13.26 ± 0.00
	Dog	Carnivora	<i>Canis familiaris</i>	–	13.63 ± 0.09
	Rat	Rodentia	<i>Rattus norvegicus</i>	–	13.36 ± 0.00
Actinopterygii	Sardine	Clupeiformes	<i>Sardina pilchardus</i>	–	11.73 ± 0.02
	Monk fish	Lophiiformes	<i>Lophius piscatorius</i>	–	10.96 ± 0.00
	Tuna	Perciformes	<i>Thunnus atlanticus</i>	–	11.56 ± 0.04
	Red mullet	Perciformes	<i>Mullus barbatus</i>	–	11.90 ± 0.06
	Nile perch	Perciformes	<i>Perca fluviatilis</i>	–	10.75 ± 0.02
	Trout	Salmoniformes	<i>Salmo fario</i>	–	10.88 ± 0.03
Liliopsida	Barley	Poales	<i>Hordeum vulgare</i>	–	12.46 ± 0.08
	Maize	Poales	<i>Zea mays</i>	–	12.09 ± 0.00
	Oat	Poales	<i>Avena sativa</i>	–	10.75 ± 0.01
	Rye	Poales	<i>Secale cereale</i>	–	11.82 ± 0.04
	Wheat	Poales	<i>Triticum aestivum</i>	–	12.03 ± 0.07
	Rice	Poales	<i>Oryza sativa</i>	–	13.79 ± 0.01
Magnoliopsida	Sunflower	Asterales	<i>Helianthus annuus</i>	–	11.85 ± 0.00
	Soybean	Fabales	<i>Glycine max</i>	–	11.41 ± 0.01
	Peanut	Fabales	<i>Arachis hypogaea</i>	–	12.58 ± 0.06
	Hazelnut	Fagales	<i>Corylus avellana</i>	–	11.85 ± 0.03
	Nut	Fagales	<i>Juglans regia</i>	–	11.09 ± 0.05
	Pistachio	Sapindales	<i>Pistacia vera</i>	–	14.48 ± 0.01
	Almond	Rosales	<i>Prunus amygdalus</i>	–	13.95 ± 0.02
Coniferopsida	Pine nut	Pinales	<i>Pinus pinea</i>	–	12.58 ± 0.06

12S rRNA A.S.S, Avian-specific system on the 12S rRNA gene (A12SDIR/A12SINV and A12SP); 18S rRNA P.A.C, Positive amplification control for the avian system on the 18S rRNA gene (18SDIR/18SINV and 18SP).

Minus sign indicates no positive signal after 50 PCR cycles.

<sup>a</sup> Average C<sub>p</sub> value ± SD shown from triplicate PCR reactions from each DNA extraction.

$$C_p = b \log[\ ] + a$$

where  $b$  is the slope and  $a$  is the intercept.

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Real-time PCR set up

In this work, a TaqMan real-time PCR method was developed for detection of avian material in farm animal feeds and pet food products. The assay targets a DNA fragment common to various avian species belonging to the anseriformes, galliformes and struthioniformes orders, and makes use of two primer/probe systems: an avian-specific mitochondrial 12S rRNA system and a universal 18S rRNA system (positive amplification control).

Any real-time PCR method focused on detection of highly degraded DNA from processed materials in feeds should reach an adequate sensitivity level. To meet this demand, two parameters are particularly crucial when setting up the PCR: the amplicon size and the gene sequence chosen as marker. In this work, an optimised primer design based on a small mitochondrial 12S rRNA

amplicon (68 bp approximately) specific for the avian group was accomplished to potentially detect the damaged DNA present in feed samples. Mitochondrial genome was targeted preferentially because it offers certain advantages compared to nuclear DNA. In particular, the presence of DNA in multiple copies in mitochondrial cells increases the likelihood of detecting a specific sequence, even when it is present in small amounts, and also increases the chance of amplifying undamaged fragments of DNA resulting after the denaturing treatments applied to feedstuffs (Bottero & Dalmaso, 2011).

The ability of real-time PCR assays to detect only the targeted species in a complex sample is of paramount importance, given that a wide representation of animal materials from different origins that can be included in compound feeding stuffs. Hence, the primers/probe system should be carefully tested against a wide number of species in order to avoid any unexpected cross-reactivity that could limit the value of the assay for routine analysis (Martin et al., 2008). In the present work, the specificity of the avian real-time PCR was evaluated by testing DNA from tissues of 41 species (birds, mammals, fish and plants). As shown in Table 1, the 12S rRNA real-time PCR system positively detected

Table 2

Results of the analysis of industrial feed samples containing different levels of declared avian content processed at different temperatures using the avian-specific real-time PCR system.

Code	Description of industrial feeds			Real-time PCR results ( $C_p$ ) <sup>a</sup>	
	Declared avian material/content (%) / T(°C)			A.S.S	P.A.C
R1	Chicken bones <sup>b</sup>	0.1	133	28.63 ± 0.06	22.96 ± 0.07
R2	Chicken bones	0.5	133	24.64 ± 0.03	24.45 ± 0.05
R3	Chicken bones	1	133	23.24 ± 0.06	21.14 ± 0.01
R4	Chicken bones	2	133	18.18 ± 0.02	23.10 ± 0.06
R5	Chicken bones	100	133	12.69 ± 0.00	20.31 ± 0.03
R6	Avian carcass <sup>c</sup>	0.1	133	30.29 ± 0.07	24.28 ± 0.05
R7	Avian carcass	0.2	133	29.10 ± 0.09	24.33 ± 0.01
R8	Avian carcass	0.5	133	28.45 ± 0.07	24.78 ± 0.03
R9	Avian carcass	1	133	27.42 ± 0.08	24.17 ± 0.04
R10	Avian carcass	2	133	25.79 ± 0.06	26.21 ± 0.01
R11	Avian carcass	100	133	18.78 ± 0.01	22.02 ± 0.02
R12	Avian muscle <sup>d</sup>	0.1	133	34.12 ± 0.06	26.19 ± 0.00
R13	Avian muscle	0.2	133	33.75 ± 0.04	26.67 ± 0.01
R14	Avian muscle	0.5	133	34.92 ± 0.05	26.81 ± 0.04
R15	Avian muscle	1	133	37.37 ± 0.07	24.19 ± 0.00
R16	Avian muscle	2	133	37.97 ± 0.05	23.01 ± 0.04
S17	Avian carcass	0.1	137	33.30 ± 0.01	25.76 ± 0.07
S18	Avian carcass	0.2	137	30.68 ± 0.03	26.51 ± 0.08
S19	Avian carcass	0.5	137	30.44 ± 0.01	26.33 ± 0.09
S20	Avian carcass	1	137	28.75 ± 0.05	25.28 ± 0.01
S21	Avian carcass	2	137	29.28 ± 0.03	24.24 ± 0.01
S22	Avian carcass	100	137	20.50 ± 0.01	23.31 ± 0.02
S23	Avian carcass	0.1	141	34.91 ± 0.05	25.21 ± 0.01
S24	Avian carcass	0.2	141	35.54 ± 0.02	24.65 ± 0.01
S25	Avian carcass	0.5	141	35.08 ± 0.03	26.17 ± 0.02
S26	Avian carcass	1	141	36.41 ± 0.03	25.49 ± 0.03
S27	Avian carcass	2	141	36.55 ± 0.09	25.31 ± 0.03
S28	Avian carcass	100	141	29.59 ± 0.06	28.01 ± 0.09
S29	Avian carcass	0.1	145	ND	24.12 ± 0.03
S30	Avian carcass	0.2	145	ND	25.76 ± 0.01
S31	Avian carcass	0.5	145	ND	24.04 ± 0.05
S32	Avian carcass	1	145	ND	25.36 ± 0.02
S33	Avian carcass	2	145	ND	25.99 ± 0.01
S34	Avian carcass	100	145	34.48 ± 0.01	29.77 ± 0.04
S35	Avian muscle	0.1	137	ND	24.21 ± 0.07
S36	Avian muscle	0.5	137	ND	26.32 ± 0.07
S37	Avian muscle	1	137	ND	25.18 ± 0.08
S38	Avian muscle	2	137	ND	24.68 ± 0.04
S39	Avian muscle	100	137	28.58 ± 0.06	25.27 ± 0.00
S40	Avian muscle	0.1	141	ND	26.35 ± 0.02
S41	Avian muscle	0.2	141	ND	24.37 ± 0.08
S42	Avian muscle	0.5	141	ND	25.19 ± 0.01
S43	Avian muscle	1	141	ND	24.85 ± 0.06
S44	Avian muscle	2	141	ND	23.06 ± 0.05
S45	Avian muscle	100	141	36.05 ± 0.08	30.93 ± 0.09
S46	Avian muscle	0.1	145	ND	25.71 ± 0.02
S47	Avian muscle	0.2	145	ND	23.44 ± 0.08
S48	Avian muscle	1	145	ND	26.64 ± 0.00
S49	Avian muscle	2	145	ND	25.33 ± 0.03
S50	Avian muscle	100	145	39.47 ± 0.06	32.21 ± 0.02
S51	Hydrolysed feather meal	100	125	28.96 ± 0.03	29.46 ± 0.00
S52	Poultry meal standard	100	133	13.94 ± 0.00	16.33 ± 0.01
S53	Poultry MBM <sup>e</sup>	100	133	11.72 ± 0.07	19.11 ± 0.02
S54	Chicken int <sup>f</sup> + bones	1	133	25.58 ± 0.02	12.78 ± 0.01
S55	Chicken int + bones	2	133	23.03 ± 0.06	19.32 ± 0.01
S56	Chicken int + bones	5	133	21.04 ± 0.03	13.24 ± 0.02
S57	Chicken int + bones	100	133	16.03 ± 0.02	17.67 ± 0.04
S58	Chicken int + MBM	100	133	17.87 ± 0.02	19.13 ± 0.06
S59	Chicken int	100	133	18.33 ± 0.04	18.37 ± 0.05
S60	Chicken int	100	137	20.01 ± 0.03	22.48 ± 0.03

All the samples were provided by the Co-operative Central Laboratory "CCL-Nutricontrol" (The Netherlands) and have been rearranged in the table according to temperature, matrix and target percentage characteristics. Samples containing concentrations from 0.1% to 5% were mixed in a porcine PAP matrix.

A.S.S, Avian-specific system on the 12S rRNA gene (*A12SDIR/A12SINV* and *A12SP*); P.A.C, Positive amplification control on the 18S rRNA gene (*18SDIR/18SINV* and *18SP*).

<sup>a</sup> Average  $C_p$  value ± SD shown from triplicate PCR reactions from each DNA extraction. ND, not detected avian samples (no positive signal after 50 PCR cycles).

<sup>b</sup> Bones: 100% bones from heads and shanks.

<sup>c</sup> Carcass: 50% bone, 20% muscle, 20% fatty tissue and 10% connective tissue/blood.

<sup>d</sup> Muscle: 100% muscle, blood (in muscle) and a trace of fat.

<sup>e</sup> MBM, meat and bone meal.

<sup>f</sup> Int (intestines): 100% mechanically washed large intestines.

all the targeted avian species: chicken, turkey, quail, pheasant, partridge, guinea fowl, duck, goose and ostrich, with  $C_p$  ranging from 10.13 to 17.16. These variations in the  $C_p$  values, which still allow consistent detection of the nine targeted bird species, are

inherent to a system designed upon a consensus sequence matching various targets that show discrete sequence differences. No positive amplification signal ( $C_p$ ) was generated on the rest of non-target species tested, while the 18S rRNA PAC system

**Table 3**  
Results of the analysis of commercial pet food products using the avian-specific real-time PCR system.

Code	Labelling description of commercial pet foods			Real-time PCR (C <sub>p</sub> ) <sup>a</sup>		
	Product type (n = 3) <sup>b</sup>	Avian material/content (%)	Other declared animal material	A.S.S	P.A.C	
A3	Dry dog food	Poultry meal	14	Salmon meal, rabbit meal	20.13 ± 0.01	14.03 ± 0.04
A6	Dry dog food	Poultry meal	NS <sup>c</sup>	Fish meal	17.88 ± 0.04	14.33 ± 0.01
A9	Dry dog food	Poultry meal	28	Fish meal, salmon oil	20.02 ± 0.01	14.96 ± 0.00
A12	Dry dog food	Poultry meal	NS	Fish meal	18.03 ± 0.05	14.78 ± 0.02
A15	Dry dog food	Poultry meal	NS	Fish meal	16.77 ± 0.03	14.44 ± 0.02
A18	Dry dog food	Poultry meal	NS	Fish meal	16.47 ± 0.08	14.56 ± 0.01
A21	Dry dog food	Poultry meal	14		18.11 ± 0.00	14.90 ± 0.03
A24	Dry cat food	Poultry meal	NS		20.61 ± 0.04	15.83 ± 0.00
A27	Dry dog food	Poultry fat	NS	Fish meal	24.63 ± 0.01	14.02 ± 0.03
A30	Dry dog food	Poultry fat	NS	Fish	24.37 ± 0.01	16.57 ± 0.01
A33	Dry dog food	Poultry fat	8.5	Fish oil	18.17 ± 0.05	16.56 ± 0.04
A36	Dry dog food	Poultry fat	NS	Rabbit meat and derivatives	21.80 ± 0.03	15.35 ± 0.05
A39	Dry dog food	Poultry fat	NS	Rabbit meal, salmon meal	24.02 ± 0.09	16.88 ± 0.09
A42	Dry cat food	Poultry fat	NS		20.12 ± 0.09	15.92 ± 0.02
A45	Dry cat food	Poultry fat	NS		23.93 ± 0.07	17.92 ± 0.06
A48	Cat food in jelly	Poultry meat	24		14.43 ± 0.01	14.36 ± 0.07
A51	Cat food in jelly	Poultry, chicken meat	24		14.46 ± 0.02	14.66 ± 0.05
A54	SM <sup>d</sup> cat food	Poultry fat	NS		22.21 ± 0.01	14.70 ± 0.01
A57	Canned cat food	Chicken, quail meat	44.8		17.86 ± 0.07	19.30 ± 0.00
A60	Canned cat food	Chicken meat	10		14.49 ± 0.02	15.92 ± 0.00
A63	Canned cat food	Chicken meat	10	Beef meat, rabbit meat	14.48 ± 0.03	14.60 ± 0.04
A66	Canned cat fillets	Chicken meat	38	Rabbit meat	15.40 ± 0.04	15.92 ± 0.06
A69	Canned cat fillets	Chicken meat	27		15.17 ± 0.01	14.00 ± 0.04
A72	Canned dog food	Chicken, pheasant meat	85.8		17.39 ± 0.05	17.92 ± 0.00
A75	SM cat food	Chicken meat	NS	Rabbit meat, pork meat	16.11 ± 0.07	17.77 ± 0.01
A78	SM cat food	Chicken meat	NS		16.07 ± 0.03	18.89 ± 0.02
A81	Canned cat food	Turkey meat	33		13.85 ± 0.00	15.17 ± 0.01
A84	Canned cat food	Turkey meat	33	Rabbit meat	14.02 ± 0.01	12.33 ± 0.02
A87	Canned dog food	Turkey meat	40	Rabbit meat	17.88 ± 0.01	15.67 ± 0.03
A90	Canned dog food	Turkey meat	40		16.77 ± 0.05	15.08 ± 0.05
A93	SM cat food	Turkey meat	5	Rabbit meat and derivatives	18.31 ± 0.00	15.89 ± 0.01
A96	SM cat food	Turkey meat	5		18.16 ± 0.03	17.61 ± 0.00
A99	Dry cat food	Quail meat	NS	Pig	23.45 ± 0.05	20.91 ± 0.03
A102	Canned cat food	Quail meat	10	Tuna	24.03 ± 0.09	18.74 ± 0.00
A105	Canned cat food	Pheasant, duck meat	NS		21.85 ± 0.01	15.12 ± 0.06
A108	Canned cat food	Pheasant meat	5	Fish and animal by-products	19.72 ± 0.03	16.17 ± 0.01
A111	Dry dog food	Ostrich meat	NS		20.33 ± 0.03	17.03 ± 0.02
A114	SM dog food	Ostrich stomach	100		21.25 ± 0.07	19.19 ± 0.00
A117	SM dog food	Ostrich intestines	100		23.60 ± 0.06	18.12 ± 0.03
A120	SM dog food	Ostrich muscle	100		20.31 ± 0.01	17.94 ± 0.06
A123	SM dog food	Ostrich muscle	100		20.33 ± 0.00	17.03 ± 0.07
A126	Canned dog food			Horse meat	30.20 ± 0.06	15.16 ± 0.01
A129	Canned dog food			Horse meat	31.79 ± 0.09	16.22 ± 0.03
A132	Canned cat food			Horse meat	30.57 ± 0.03	16.04 ± 0.00
A135	Canned cat food			Horse meat, porcine meat	34.07 ± 0.09	17.48 ± 0.09
A138	Pâté			Horse meat	34.15 ± 0.10	15.27 ± 0.02
A141	Pâté			Horse meat	30.64 ± 0.05	16.76 ± 0.01
A144	SM dog food			Horse muscle	ND <sup>e</sup>	14.13 ± 0.01
A147	SM dog food			Horse stomach	ND	14.98 ± 0.03
A150	Dry dog food			Ocean fish meal, salmon meal	16.96 ± 0.08	15.28 ± 0.07
A153	Canned cat food			Ocean fish	19.49 ± 0.02	17.80 ± 0.01
A156	Canned cat food			Ocean fish, animal meat and derivatives	20.62 ± 0.01	20.29 ± 0.04
A159	Dry dog food			Fish meal, shellfish meal	30.84 ± 0.07	14.06 ± 0.00
A162	Dry dog food			Fish meal, shellfish meal	ND	14.45 ± 0.03
A165	Dry dog food			Fish, venison	ND	16.59 ± 0.07
A168	Canned dog food			Fish, sardine	ND	15.24 ± 0.01
A171	Canned cat food			Fish, tuna, prawn	25.48 ± 0.02	16.63 ± 0.02
A174	Canned cat food			Rabbit meat and derivatives	20.57 ± 0.06	16.56 ± 0.02
A177	Canned cat food			Rabbit meat and derivatives	31.62 ± 0.01	20.78 ± 0.09
A180	Canned cat food			Rabbit and beef meat and derivatives	ND	19.16 ± 0.00
A183	Canned meat			Rabbit meat and derivatives	22.53 ± 0.09	15.97 ± 0.02
A186	Cat food in jelly			Rabbit and lamb meat and derivatives	16.02 ± 0.06	16.16 ± 0.01
A189	Dry dog food			Rabbit meat and derivatives	25.75 ± 0.20	12.97 ± 0.03
A192	Pâté cat food			Rabbit meat and derivatives	21.58 ± 0.05	18.45 ± 0.09
A195	Pâté cat food			Rabbit meat and derivatives	14.78 ± 0.02	16.54 ± 0.02

(continued on next page)



Table 3 (continued)

Code	Labelling description of commercial pet foods			Real-time PCR ( $C_p$ ) <sup>a</sup>	
	Product type ( $n = 3$ ) <sup>b</sup>	Avian material/content (%)	Other declared animal material	A.S.S.	P.A.C.
A198	Dry dog food		Rabbit meal dehydrated	20.19 ± 0.01	19.30 ± 0.06
A201	SM dog food		Rabbit meat	15.73 ± 0.00	15.47 ± 0.00
A204	Canned cat food		Rabbit meat	18.02 ± 0.05	15.35 ± 0.02
A207	Canned dog food		Rabbit meat	ND	16.18 ± 0.06
A210	Dry cat food		Rabbit meal	22.59 ± 0.04	19.41 ± 0.06

Samples were arranged according to the animal species/type declared in the label.

A.S.S., Avian-specific system on the 12S rRNA gene (*A12SDIR/A12SINV* and *A12SP*); P.A.C., Positive amplification control on the 18S rRNA gene (*18SDIR/18SINV* and *18SP*).

<sup>a</sup> Average  $C_p$  value ± SD shown from triplicate PCR reactions from each DNA extraction.

<sup>b</sup> Number of batches analysed from each pet food type.

<sup>c</sup> NS: not specified content.

<sup>d</sup> SM: semi-moist.

<sup>e</sup> ND: not detected (no positive signal after 50 PCR cycles).

				<i>A12SDIR</i> →		<i>A12SP</i>	70
Consensus		CCACCTnnAA	TGAAAGAACA	ACAGTGAGCn	CAATAGTnCC	CnCACTAAnA	AGACAGGTCA AGGTATAGCC
<i>C. moschata</i>	(GenBankID: L16769)	CCACCTcgAA	TGAgAGcACA	<b>ACAGTGAGCg</b>	<b>CAAcAGCaCC</b>	CcCgCTAAAtA	AGACAGGTCA AGGTATAGCC
<i>A. anser</i>	(GenBankID: NC_011196)	CCACCTcgAA	TGAgAGcACA	<b>ACAGTGgaCa</b>	<b>CAATAGCaCC</b>	Cc-gCTAAAtA	AGACAGGTCA AGGTATAGCC
<i>M. gallopavo</i>	(GenBankID: NC_010195)	CCACCTaaAA	TGAAAGAtCA	<b>AtAGTGAGCt</b>	<b>CAATAGt-CC</b>	-gCACTAAcA	AGACAGGTCA AGGTATAGCC
<i>P. colchicus</i>	(GenBankID: NC_015526)	CCACCTaaA-	TGAAAGgcCA	<b>ACAGTGAGCt</b>	<b>CAAcAGt-CC</b>	acCACTAgcA	AGACAGGTCA AGGTATAGCC
<i>G. gallus</i>	(GenBankID: AY235570)	CCACCTctAA	TGAAAGAACA	<b>ACAGTGAGCt</b>	<b>CAATAGC-CC</b>	CtCgCTAAAtA	AGACAGGTCA AGGTATAGCC
<i>N. meleagris</i>	(GenBankID: AP005595)	CCACCTacA-	TGAAAGcgCA	<b>ACAGTGAGCt</b>	<b>CAAcAGt-CC</b>	C-CACTAAcA	AGACAGGTCA AGGTATAGCC
<i>C. coturnix</i>	(GenBankID: AM902516)	CCACCT-tAA	TGAAAGAACA	<b>ACAGTGAGCt</b>	<b>CAATAGC-Cg</b>	C-CACTAAAtA	AGACAGGTCA AGGTATAGCC
<i>A. chukar</i>	(GenBankID: FJ752426)	tCACCTccAA	TGAAAGAgCA	<b>ACAGTGAGCc</b>	<b>CAAcAGt-Ct</b>	C-CACTAAAtA	AGACAGGTCA AGGTATAGCC
<i>S. camelus</i>	(GenBankID: Y12025)	CCgCCTc- -A	TGAgAGAAcA	<b>AtAGcGAGCa</b>	<b>CAATAGCcCa</b>	CcCgCTAAcA	AGACAGGTCA AGGTATAGCa
<i>B. taurus</i>	(GenBankID: AF492351)	aaACCTtaA-	-aAAGGAaA	<b>AaAGTaAGCg</b>	<b>tAATtat-ga</b>	taCataAAaA	cGttAGGTCA AGGTgTAGCC
<i>S. scrofa</i>	(GenBankID: NC_012095)	aaACCTctAA	-aAAGGAaA	<b>AtAGTaAGCa</b>	<b>CAATcat-ag</b>	CaCataAAaA	cGttAGGTCA AGGTgTAGCC
<i>E. caballus</i>	(GenBankID: X79547)	aaACCTctAA	acAAGGtAcc	<b>gaAGTaAGCa</b>	<b>CAAtat-CC</b>	aaCataAAaA	cGttAGGTCA AGGTgTAGCC
Consensus		CCACCTnnAA	TGAAAGAACA	ACAGTGAGCn	CAATAGTnCC	CnCACTAAnA	AGACAGGTCA AGGTATAGCC
← <i>A12SINV</i>							
Consensus		cATGG-GgTG	GAAGAAATGG	GCTACATTTT	CTAnACnAnT	AGAACAn---	-cACGAAAA GgnCATGAAA
<i>C. moschata</i>	(GenBankID: L16769)	cATGG-GcTg	<b>GAAGAAATGG</b>	GCTACATTTc	CTAcAC-AcT	AGggCAg---	-CAGGAAAAg aagCATGAAA
<i>A. anser</i>	(GenBankID: NC_011196)	TATGG-aGTG	<b>GAAGAAATGG</b>	GCTACATTTc	CTAttC-A-T	AGggCA----	-CAGGAAAAg aagCATGAAA
<i>M. gallopavo</i>	(GenBankID: NC_010195)	cATGa-GGTG	<b>GAAGAAATGG</b>	GCTACATTTT	CTA-AC-A-T	AGAACAg---	-ACGAAAAA GggCATGAAA
<i>P. colchicus</i>	(GenBankID: NC_015526)	cATGG-GGTG	<b>GAAGAAATGG</b>	GCTACATTTT	CTA-At-A-T	AGAAtAa---	-ACGAAAAA GgaCATGAAA
<i>G. gallus</i>	(GenBankID: AY235570)	TATGG-GGTG	<b>GAAGAAATGG</b>	GCTACATTTT	CTA-AC-A-T	AGAACAA---	-ACGAAAAA GgaCATGAAA
<i>N. meleagris</i>	(GenBankID: AP005595)	cATGGaGGTG	<b>GAAGAAATGG</b>	GCTACATTTT	CTA-gC-A-T	AGAACAct--	-CAGGAAAAg aagCATGAAA
<i>C. coturnix</i>	(GenBankID: AM902516)	TATGG-GaTG	<b>GAAGAAATGG</b>	GCTACATTTT	CTA-Aa-A-T	AGAACAA---	-ACGAAAAA GgaCATGAAA
<i>A. chukar</i>	(GenBankID: FJ752426)	cATGG-GaTG	<b>GAAGAAATGG</b>	GCTACATTTT	CTA-AC-A-T	AGAACAA---	-ACGAAAAA GgaCATGAAA
<i>S. camelus</i>	(GenBankID: Y12025)	TATGG-aGTG	<b>GAAGAAATGG</b>	GCTACATTTT	CTA-AC-A-T	AGAAtAca--	-CAGGAAAAg GgatATGAAA
<i>B. taurus</i>	(GenBankID: AF492351)	TATGaaatgG	<b>GAAGAAATGG</b>	GCTACATTTc	CTAcACcAag	AGAAtcaa--	gCAGGAAAgT tattATGAAA
<i>S. scrofa</i>	(GenBankID: NC_012095)	TATGGgttgG	<b>GAAGAAATGG</b>	GCTACATTTT	CTAcAt-Aag	AatAtccacc	aCAGGAAAgT ttttATGAAA
<i>E. caballus</i>	(GenBankID: X79547)	cATGGgatgG	<b>GAAGAAATGG</b>	GCTACATTTT	CTAccctAag	AacAagaact	ttAaccgggA cctCtTGAAA
Consensus		cATGG-GgTG	GAAGAAATGG	GCTACATTTT	CTAnACnAnT	AGAACAn---	-cACGAAAA GgnCATGAAA

Fig. 1. DNA partial sequence of the mitochondrial 12S rRNA gene of chicken (*G. gallus*), turkey (*M. gallopavo*), quail (*C. coturnix*), pheasant (*P. colchicus*), partridge (*A. chukar*), guinea fowl (*N. meleagris*), duck (*C. moschata*), goose (*A. anser*), ostrich (*S. camelus*), cattle (*B. taurus*), swine (*S. scrofa*) and rat (*R. norvegicus*). Bold-type and underlined nucleotides indicate the position of primers *A12SDIR* and *A12SINV* used for PCR amplification. TaqMan probe (*A12SP*) is shaded.

amplified a 77 bp fragment from all eukaryotic species analysed.

Once the suitability and specificity of the real-time PCR were determined, the applicability of the assay to detect avian DNA was tested through analysis of different feeds destined for farm animals and pets.

### 3.2. Analysis of farm animal feeds

A batch of 60 industrial feeds rendered at temperatures ranging from 125 to 145 °C and containing different concentrations of avian tissues (from 0.1% to 100%) were tested with the avian real-time PCR developed (Table 2).

To assess the sensitivity of the assay, initial analyses were done with feeds rendered at 133 °C and containing different levels of avian material of various tissue-types: bones, carcase, muscle and intestines. Avian DNA was successfully detected in all the

samples, even at the lowest concentration levels assayed (0.1%) (Table 2). However, depending on the nature of the tissue tested, highly variable PCR amplification results (expressed as  $C_p$  values) were achieved, suggesting that bone tissue is much less affected by severe processing temperatures than muscle tissue. These observations are in line with other works that argue that survival of DNA to drastic processes is particularly manifested in bones, where the DNA molecule is stabilised by mineral sorption (Collins et al., 2002; Fumière et al., 2009; Götherström, Collins, Angerbjörn, & Lidén, 2002), and may explain the lower  $C_p$  values obtained in meals containing bone tissue compared with meals containing other types of tissue.

The effectiveness of the avian real-time PCR was further investigated in feeds subjected to more severe heat treatments (137, 141 and 145 °C) and containing different concentrations of avian tissues (from 0.1% to 100%). Results obtained showed that, as the rendering temperatures increase, the assay sensitivity is reduced,

impeding detection in some samples (denoted as ND in Table 2). With respect to carcase feeds (S17–S34), avian detection was accomplished in samples treated at 137 and 141 °C, whereas at the highest temperature tested (145 °C) only sample S34 containing 100% target gave a positive PCR signal. Meanwhile, in muscle feeds (S35–S50) positive detection was only possible in pure PAPs (100% avian) (S39, S45 and S50). It can be therefore concluded that, depending on the tissue present in the feed, as rendering temperatures increase above those normally employed for the feed production process (133 °C), the  $C_p$  will be higher and a threshold will be reached above which detection of PAPs in feeds may turn unattainable. However, this shortcoming is rather theoretical, since economic and nutritional reasons prevent renderers from greatly exceeding the minimum legal requirements for sterilisation temperature (133 °C) (Gizzi et al., 2003). Besides the avian-derived industrial feeds analysed in this work, several samples containing avian-free PAPs were tested and no PCR signal was generated (results not shown), supporting the ability of the assay to correctly classify the feed samples with regard to presence/absence avian material. The positive detection obtained with the 18S rRNA system in all the tested industrial feed samples is indicative of the presence of PCR-amplifiable eukaryotic DNA.

The obtained results agree with other studies reporting the influence of aggressive sterilisation treatments in PCR sensitivity when attempting detection of PAPs in industrial feeds rendered at different temperatures up to 145 °C (Chiappini et al., 2005; Fumière, Dubois, Baeten, von Holst, & Berben, 2006). The industrial feed samples analysed in this work are representative of the real world feed ingredients and processing treatments dictated by European regulations, which adds a practical value when compared with other PCR-based assays using either laboratory-scale prepared samples that do not reproduce the rendering processes

of commercial feeds, or a more limited sample representation (Frezza et al., 2008; Tanabe et al., 2007; Yancy et al., 2009).

### 3.2.1. Quantitative capability of the assay

Species content and treatment characteristics of industrial feed batches allowed us to attempt the assessment of the quantification ability of the assay. For this purpose, PCR amplification efficiency and correlation coefficient  $R^2$  of the avian real-time PCR system were calculated from a regression line of  $C_p$  values obtained from two sets of industrial feeds manufactured with either bones (R1–R4) or carcase (R6–R10) tissues (Fig. 2A and B, respectively), containing increasing amounts of the corresponding target concentration and subjected to identical temperature processing (133 °C). As shown in the figures, the resulting theoretical slopes of the avian standard curves showed values near to the slope's value of  $-3.32$ , corresponding to a 100% PCR efficiency in each cycle. However, in agreement with the previously described findings, the standard curves showed variations depending on the tissue considered (bones or carcase). It should be noted that  $C_p$  values obtained for the muscle-tissue feeds treated at 133 °C (R12–R16) correlated with a low PCR efficiency and, therefore, construction of a calibration standard curve was not possible for this particularly array of samples.

Quantification of target amount in unknown samples is accomplished by measuring  $C_p$  values and using the standard curves to determine the target DNA concentration. The positive correlation between the obtained fluorescence values and target DNA concentration suggests that the real-time PCR technique developed has the potential for quantitative determination of avian PAP in feeds. However, for accurate quantification, the amplification efficiency of the target must be the same as for the standard. Thus, when applied to analyses of unknown feeds, the heterogeneous tissue-types and ingredients that can be present, together with the different processing treatments applied to the samples, unavoidably limits the quantitative ability of the real-time PCR method. Therefore, quantification would only be usable when a defined set of samples with identical features in terms of composition and processing are available for the preparation of suitable calibration standards. Further, the unequal system affinity for DNA belonging to different avian species means that DNA standards for each species of interest would be required for precise quantitative analyses. Although these considerations restrict the quantitative application of the results, they do not compromise the ability of the real-time PCR technique to qualitative detect one or more avian species present in a feed with high selectivity and sensitivity.

### 3.3. Analysis of pet feeds

Pet feed manufacturers may claim that their products contain high biological value proteins (e.g. proteins from avian species), but there is no guarantee that avian tissues will not be fraudulently substituted by other questionable protein sources which are not declared in the feed label, causing economic damage and compromising the pet's health. Moreover, presence of undeclared avian ingredients in food and feed may also pose a health threat, since certain animal proteins including avian tissues may be cause of allergies in sensitised animals (Hefle, Jeanniton, & Taylor, 2001).

The avian real-time PCR was tested for its ability for species authentication in a total of 210 commercial dog and cat feed products basically formulated as dry, semi-moist and canned depending on the processing methods used by producers. Of them, 123 were labelled to contain a varied assortment of avian material, whereas 87 samples did not declare any avian ingredient in their labels (Table 3). Analyses performed on the 123 pet food samples declaring avian indicated that the real-time PCR system successfully detected the presence of avian material in 100% of the pro-

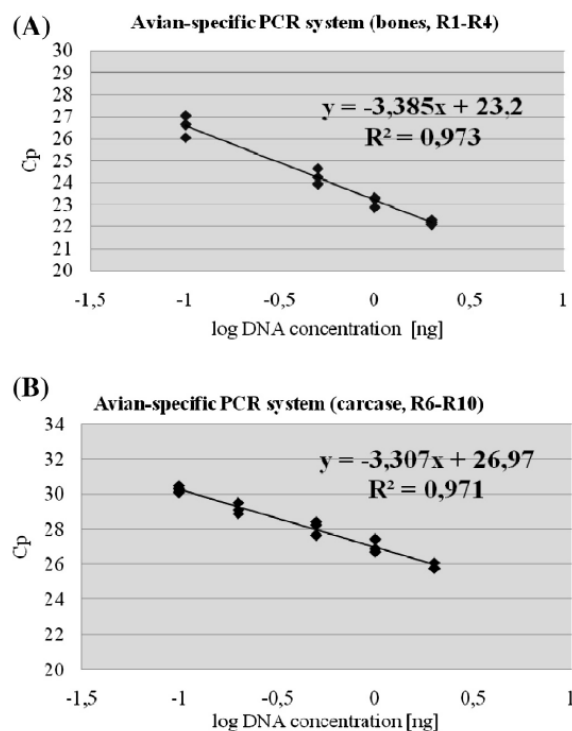


Fig. 2.  $C_p$  values obtained from avian bones 1(a) and carcase 1(b) reference samples, plotted versus the logarithm of the DNA concentrations.

cessed feeds labelled to include poultry and/or different defined avian-class species (chicken, turkey, quail, pheasant, duck and ostrich) in their composition. Detected avian content ranged from 5% to 100%, with some samples of unknown avian percentage (denoted as NS in the table). Three different batches from each pet food sample-type were included in the analysis, with no significant variability observed in the  $C_p$  values. Likewise, the real-time PCR yielded a straightforward and homogeneous positive signal in the different avian materials analysed: meal, meat, fat, stomach, intestines and muscle. It should be noted that a number of the retail pet foods analysed contained by-products labelled as “poultry”. The generic term “poultry” refers to any farmed bird kept by humans for the purpose of producing meat, eggs and/or feathers. Although chicken is by far the predominant species used in feed production, poultry also covers other domestic fowl like turkey, duck or goose which can enter the rendering plant to be processed along with chicken, as well as other birds that are not considered as domestic but which are farmed as domestic animals (e.g. pheasants, guinea fowls, etc.), with the exception of ratites (Regulation 853/2004/EC).

Results obtained on the analyses of the rest 87 pet food products labelled as avian-free (Table 3) evidenced that only 21 of them (24.1%) gave no positive signal in the real-time PCR assay, showing agreement with the labelling. However, the straightforward positive signal achieved in almost half of these products (42 samples, with  $C_p$  between 14.78 and 25.75), suggest the existence of an intentional fraud, since poultry DNA is clearly detected while no labelling indication of avian ingredients is provided by suppliers. As can be seen in the Table, the rest 24 samples (27.6%) yielded late  $C_p$  values (above 30). This result may be indicative of the presence of avian DNA traces in such samples, which may be ascribed to inherent cross-contamination at some stage of feed manufacturing. It should be stressed that cross-contamination at feed/food processing plants represents a frequent problem, since raw materials may remain adhered to surfaces and equipments, causing carry-over into subsequent manufactured batches (Gizzi et al., 2003).

During the last decade, an increasing number of researchers have centred their attention on the development of sensitive and versatile PCR methodologies for the identification of animal species in farm animal feeds (Fumière, Mariena, Fernández-Pierna, Baeten, & Berben, 2010; Kusama, Nomura, & Kadowaki, 2004; Prado et al., 2007). However, to our knowledge, very few works are available in the literature up to now focused on species authentication of products destined for the feeding of pets, and these generally test for a limited representation of commercial samples (Dalmaso et al., 2004; Myers, Farrell, Heller, & Yancy, 2004; Wang, Lee, Chang, & Wong, 2004). In this work, the applicability of the avian real-time PCR assay developed for pet food authentication was corroborated through the analysis of a wide range of products representing a realistic sampling of commercially available feeds, which gives a practical dimension to the work.

As occurs with farm animal feeds, quantitative analysis of pet feeds is not feasible from a pragmatic perspective. Nevertheless, the proposed real-time PCR system demonstrated its capability as a rapid screening tool to monitor the presence/absence of avian material from different species and sources in processed commercial pet foods, providing an opportunity to verify compliance with legislation.

#### 4. Conclusion

The real-time PCR method developed in this work allowed qualitative and sensitive detection of highly processed avian material in a wide range of animal feeds and pet foods. In particular, the ability of the technique to identify avian PAPs in complex farm animal feeds can be of concern in a near future, if a partial lift of the

“total feed ban” takes place, allowing the re-entry of certain non-ruminant PAPs into mono-gastric animal feed. Overall, the herein described real-time PCR protocol offers an alternative and sensitive tool for verifying labelling and traceability regulations within the feed sector.

#### Acknowledgements

The authors are indebted to Dr. R. Margry from CCL-Nutricontrol (The Netherlands) for kindly providing us with the industrial feed samples analysed in this study. This work was supported by the Programa de Vigilancia Sanitaria 2009/AGR/1489 of the Comunidad de Madrid (Spain) and by a Project (AGL2010/15279) from the Ministerio de Ciencia e Innovación (Spain). Nicolette Pegels is recipient of a fellowship from the Ministerio de Educación (Spain).

#### References

- Ballin, N. Z., Finn, K., Vogensen, A., & Karlsson, H. (2009). Species determination – Can we detect and quantify meat adulteration? *Meat Science*, 83, 165–174.
- Bottero, M. T., & Dalmaso, A. (2011). Animal species identification in food products: Evolution of biomolecular methods. *The Veterinary Journal*, 190, 34–38.
- Casazza, A. P., Gavazzi, F., Mastromauro, F., Giani, S., & Breviario, D. (2011). Certifying the feed to guarantee the quality of traditional food: An easy way to trace plant species in complex mixtures. *Food Chemistry*, 124, 685–691.
- Chiappini, B., Brambilla, G., Agrimi, U., Vaccari, G., Aarts, H. J. M., Berben, G., et al. (2005). Real-time PCR approach for quantitation ruminant-specific DNA to indicate a correlation between DNA amount and meat and bone meal heat treatments. *Journal of AOAC International*, 88, 1399–1403.
- Collins, M. J., Nielsen-Marsh, C. M., Hiller, J., Smith, C. I., Roberts, J. P., Prigodich, R., et al. (2002). The survival of organic matter in bone: A review. *Archaeometry*, 44, 383–394.
- Dalmaso, A., Civera, T., la Neve, F., & Bottero, M. T. (2011). Simultaneous detection of cow and buffalo milk in mozzarella cheese by real-time PCR assay. *Food Chemistry*, 124, 362–366.
- Dalmaso, A., Fontanella, E., Piatti, P., Civera, T., Rosati, S., & Bottero, M. T. (2004). A multiplex PCR assay for the identification of animal species in feedstuffs. *Molecular and Cellular Probes*, 18, 81–87.
- EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). (2011). Scientific opinion on the revision of the quantitative risk assessment (QRA) of the BSE risk posed by processed animal proteins (PAPs). *EFSA Journal*, 9, 1947.
- Frezza, D., Favaro, M., Vaccari, G., von Holst, C., Giambra, V., Anklam, E., et al. (2003). A competitive polymerase chain reaction-based approach for the identification and semiquantification of mitochondrial DNA in differently heat-treated bovine meat and bone meal. *Journal of Food Protection*, 66, 103–109.
- Frezza, D., Giambra, V., Chegiani, F., Fontana, C., Maccabiani, G., Losio, N., et al. (2008). Standard and light-cycler PCR methods for animal DNA species detection in animal feedstuffs. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 9, 18–23.
- Fumière, O., Dubois, M., Baeten, V., von Holst, C., & Berben, G. (2006). Effective PCR detection of animal species in highly processed animal byproducts and compound feeds. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 385, 1045–1054.
- Fumière, O., Mariena, A., Fernández-Pierna, J. A., Baeten, V., & Berben, G. (2010). Development of a real-time PCR protocol for the species origin confirmation of isolated animal particles detected by NIRM. *Food Additives and Contaminants*, 27, 1118–1127.
- Fumière, O., Veys, P., Boix, A., von Holst, C., Baeten, V., & Berben, G. (2009). Methods of detection, species identification and quantification of processed animal proteins in feedingstuffs. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment*, 13, 59–70.
- Gizzi, G., van Raamsdonk, L. W. D., Baeten, V., Murray, I., Berben, G., Brambilla, G., et al. (2003). An overview of tests for animal tissues in feeds applied in response to public health concerns regarding bovine spongiform encephalopathy. *Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)*, 22, 311–331.
- Goffaux, F., China, B., Dams, L., Clinquart, A., & Daube, G. (2005). Développement of a genetic traceability test in pig based on single nucleotide polymorphism detection. *Forensic Science International*, 151, 239–247.
- Götherström, A., Collins, M. J., Angerbjörn, A., & Lidén, K. (2002). Bone preservation and DNA amplification. *Archaeometry*, 44, 395–404.
- Hefle, S. L., Jeannot, E., & Taylor, S. L. (2001). Development of a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of egg residues in processed foods. *Journal of Food Protection*, 64, 1812–1816.
- Kang, J. H., & Kondo, F. (2002). Determination of bisphenol A in canned pet foods. *Research in Veterinary Science*, 73, 177–182.
- Kusama, T., Nomura, T., & Kadowaki, K. (2004). Development of primers for detection of meat and bone meal in ruminant feed and identification of the animal of origin. *Journal of Food Protection*, 67, 1289–1292.
- Lockley, A. K., & Bardsley, R. G. (2000). DNA-based methods for food authentication. *Trends in Food Science & Technology*, 11, 67–77.

- Martín, I., García, T., Fajardo, V., Rojas, M., Hernández, P. E., González, I., et al. (2008). Real-time PCR for quantitative detection of bovine tissues in food and feed. *Journal of Food Protection*, 71, 564–572.
- Momcilovic, D., & Rasooly, A. (2000). Detection and analysis of animal materials in food and feed. *Journal of Food Protection*, 63, 1602–1609.
- Myers, M. J., Farrell, D. E., Heller, D. N., & Yancy, H. F. (2004). Development of a polymerase chain reaction based method to identify species-specific components in dog food. *American Journal of Veterinary Research*, 65, 99–103.
- Pascoal, A., Barros-Velázquez, J., Ortea, I., Cepeda, A., Gallardo, J. M., & Calo-Mata, P. (2011). Molecular identification of the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*), the white leg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) and the Indian white shrimp (*Fenneropenaeus indicus*) by PCR targeted to the 16S rRNA mtDNA. *Food Chemistry*, 125, 1457–1461.
- Pegels, N., González, I., Martín, I., Rojas, M., García, T., & Martín, R. (2011). Applicability assessment of a real-time PCR assay for the specific detection of bovine, ovine and caprine material in feedstuffs. *Food Control*, 22, 1189–1196.
- Pereira, F., Carneiro, J., & Amorim, A. (2008). Identification of species with DNA-based technology: Current progress and challenges. *Recent Patents on DNA & Gene Sequences*, 2, 187–200.
- Prado, M., Berben, G., Fumière, O., van Duijn, G., Mensinga-Kruize, J., Reaney, S., et al. (2007). Detection of ruminant meat and bone meals in animal feed by real-time polymerase chain reaction: Result of an interlaboratory study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 7495–7501.
- Regulation 767/2009/EC of the European Parliament and of the Council of 13 July 2009 on the placing on the market and use of feed, amending European parliament and council regulation (EC) No. 1831/2003 and repealing council directive 79/373/EEC, commission directive 80/511/EEC, council directives 82/471/EEC, 83/228/EEC, 93/74/EEC, 93/113/EC and 96/25/EC and commission decision 2004/217/EC. *Official Journal of European Communities*, L229, 1–28.
- Regulation 853/2004/EC of the European Parliament and of the Council of 29 April 2004 laying down specific hygiene rules for on the hygiene of foodstuffs. *Official Journal of European Communities*, L139, 55–205.
- Regulation 999/2001/EC of the European Parliament and of the Council of 22 May 2001 laying down rules for the prevention, control and eradication of certain transmissible spongiform encephalopathies. *Official Journal of European Communities*, L147, 1–205.
- Tanabe, S., Hase, M., Yano, T., Sato, M., Fujimura, T., & Akiyama, H. (2007). A real-time quantitative PCR detection method for pork, chicken, beef, mutton, and horseflesh in foods. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 71, 3131–3135.
- Wang, H. C., Lee, S. H., Chang, T. J., & Wong, M. L. (2004). Examination of meat components in commercial dog and cat feed by using polymerase chain reaction–restriction fragment length polymorphisms (PCR–RFLPs) technique. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 66, 855–859.
- Yancy, H. F., Washington, J. D., Callahan, L., Mason, J. A., Deaver, C. M., Farrell, D. E., et al. (2009). Development, evaluation, and peer verification of a rapid real-time PCR method for the detection of animal material. *Journal of Food Protection*, 72, 2368–2374.



Contents lists available at ScienceDirect

Food Chemistry

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/foodchem](http://www.elsevier.com/locate/foodchem)



Corrigendum

Corrigendum to “Avian-specific real-time PCR assay for authenticity control in farm animal feeds and pet foods” [Food Chem. 142 (2014) 39–47]



Nicolette Pegels, Isabel González\*, Teresa García, Rosario Martín

*Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain*

---

The authors would like amend an error in the nucleotide sequence of the TaqMan probe A12SP of the original article (Section 2. Materials and methods; subsection 2.3. Primers and probes design). The correct nucleotide sequence appears below.

The authors apologise for any inconvenience caused.

A12SP: 5'-6FAM-CTATACCT+TGA+C+C+TGTCTT-BBQ-3'

### III.1.3. FISH

**Detection of fish-derived ingredients in animal feeds by a TaqMan real-time PCR assay.**



**Food Analytical Methods**  
*Volume 6, pages 1040-1048, 2013*



## Detection of Fish-Derived Ingredients in Animal Feeds by a TaqMan Real-Time PCR Assay

Nicolette Pegels · Isabel González · Inés López-Calleja · Teresa García · Rosario Martín

Received: 25 September 2012 / Accepted: 13 December 2012 / Published online: 29 January 2013  
 © Springer Science+Business Media New York 2013

**Abstract** Animal species identification in food and feed has gained increasing interest in recent years due to public health, economic and legal concerns. In the present work, a TaqMan real-time PCR assay targeting the mitochondrial 12S rRNA gene was developed for detection of a specific DNA fragment (87 bp) common to the most economically important fish families in fish-derived ingredients used in feed formulations. Performance of the assay was evaluated against stringent acceptance criteria in terms of specificity and sensitivity. The TaqMan real-time fish-specific system proved to be highly sensitive, allowing the detection of 0.1 pg of fish DNA. The assay was successfully applied to the authentication of two types of real-world compound feeds: industrial farm animal feeds and commercial pet foods, allowing detection of small fish percentages in the samples. The quantitative potential of the real-time PCR assay was further performed, concluding that, although results were well reproducible under the experimental conditions tested, an accurate estimation of the target content in feeds is not feasible in practice. The reported methodology may be useful as a molecular analytical tool to support fisheries control and enforcement, as well as the verification of authenticity of fish and fish-derived products in the food and feed sectors.

**Keywords** TaqMan real-time PCR · 12S rRNA gene · Fish meal · Farm animal feeds · Pet foods · Traceability

### Introduction

Globalization in the fish industry in terms of sourcing raw materials, processing and marketing has resulted in demands for increased traceability of food and feed. Concerning the feed sector, fish meal is one of the most commonly used fish-derived materials in the preparation of compound diets for poultry, pigs and farmed fish, as well as for pet animals. Fish meal is known for its balanced amino acids profile and omega 3 fatty acids content, high digestibility and palatability, the presence of potential growth factors, and it is highly improbable that complete replacement will be possible with a single alternative protein source (Zhou et al. 2011). Therefore, this fish derivative is in high demand for many feeding diets formulated to ensure high quality livestock and to improve animal health and welfare.

Species verification in feeds is a legal traceability requirement and is performed for various reasons including economic and health issues. In the context of bovine spongiform encephalopathy (BSE) prevention, one of the most effective risk-reducing measures relies on the total EU wide ban on the use of processed animal protein in feeds for any animal farmed for the production of food, with some exceptions (e.g., use of fish meal in non-ruminants) (EC999/2001). Besides, with regards to the pet food sector, Regulation EC767/2009 on the placing on the market and use of feed, includes the basic rules for the way information must be provided in food products intended for oral feeding to household. However, in spite of the existence of mandatory traceability requirements for farm animal and pet feeds, labels do not always provide sufficient guarantee about the real species and nutrient composition of a product. Besides the economical fraud, the presence of non-declared fish derivatives in food and feed may pose a health threat, since fish is one of the most common causes of food allergies in sensitized humans and animals (Wild and

N. Pegels · I. González (✉) · I. López-Calleja · T. García · R. Martín  
 Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain  
 e-mail: gonzalzi@vet.ucm.es



Lehrer 2005). Consequently, there is a need for reliable, accurate and powerful analytical techniques to enforce the legislative frame and allow the authentication of fish-derived materials in feeds (Chiappini et al. 2005; Goffaux et al. 2005).

Protein-based methodologies are not suitable for routine species identification in complex matrices such as feeds subjected to heat and pressure treatments which induce marked structural modification of proteins (Asensio 2007). Thus, for species authentication in heat-processed products, a DNA method rather than protein analysis is preferable (Lockley and Bardsley 2000). In particular, Regulation EC1224/2009 about a Community control system for ensuring compliance with the rules of the common fisheries policy explicitly refers in article 13 to the use of “new technologies” such as genetic techniques in order to improve fish traceability and safety. Molecular methods based on PCR have occupied a central position in fish species identification due to the extraordinary power of PCR to increase target DNA copy numbers from few copies to easily detectable quantities (Ali et al. 2012; Teletchea 2009). PCR amplification techniques are therefore particularly useful when the product to be authenticated contains fragmented DNA, like the case of highly processed fish meal and other fish derivatives that undergo autoclaving as specified by European regulations. Real-time PCR, in particular, provides the advantages of allowing the nucleic acid amplification and detection steps in the same closed vessel, minimizing the risk of releasing contaminant amplified nucleic acids into the environment. Plus, real-time PCR instrumentation requires considerably low hands-on time, and detection of amplified products is automated, simple and reproducible (Espy et al. 2006). Among the different available chemistries, real-time PCR using TaqMan probes offers an optimal choice when specific and sensitive detection of very small DNA targets is required.

Considering these aspects, and the fact that the limited number of real-time PCR assays published to date focused on detection of fish DNA in feeds (Benedetto et al. 2011; Dalmaso et al. 2004; Martín et al. 2010; Prado et al. 2012), this study was based on the application of a real-time PCR assay for the detection of fish derivatives utilized as common ingredients in farm animal feeds and pet food products. The assay makes use of short mitochondrial 12S rRNA fish sequences and it is based upon TaqMan-LNA probe chemistry.

## Materials and Methods

### Sample Selection

In this work, a representative number of feeds for farm animals and household pets were selected for analysis.

Farm animal feed test materials were provided by the Community Reference Laboratory for Animal Protein in Feedingstuffs (CRA-W, Gembloux, Belgium), and consisted of 21 animal feeds (seven reference plus 14 blind samples) containing fish meal concentrations ranging from 0 % to 100 % (Table 1). Fish-derived samples were produced under strict controlled and recorded processing conditions in accordance with the processing methods set out in Regulation EC142/2011 for fish meal processing so as to render them suitable for direct use as feed material or for any other use in feedingstuffs, including pet food.

A total of 100 commercial dog, cat and fish food products of distinct brands and characteristics, labeled to contain different fish materials, were purchased from several retail markets and pet shops (Table 2).

### DNA Extraction

Genomic DNA was obtained from 200 mg of each test sample using the Wizard DNA Clean-up System kit (Promega, Madison, WI, USA) as described by Pegels et al. (2011). The DNA was eluted in 100 µl of sterile deionized water and its concentration was measured with a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies Inc., Montchanin, DE, USA). Unless otherwise stated, three DNA replicates were extracted from each sample. A negative control sample was included in every DNA extraction.

### Primers and Probes Design

The primers used in the real-time PCR assay developed in this work (*12SpFISHDIR*–*12SpFISHINV*) were those previously described (Martín et al. 2010) for SYBR-Green real-time PCR detection of a fish-specific 87-bp DNA fragment common to the most economically important fish families (e.g., gadoids, scombroids, salmonids, flatfishes), including the following 39 fish species: *Engraulis encrasicolus*, *Sarda sarda*, *Gadus morhua*, *Hippoglossus hippoglossus*, *Clupea harengus*, *Brama brama*, *Salmo salar*, *Pagellus erythrinus*, *Pagellus bogaraveo*, *Thunnus thynnus*, *Trachurus trachurus*, *Prionace glauca*, *Diplodus sargus*, *Auxis rochei*, *Pangasius hypophthalmus*, *Pleuronectes platessa*, *Lepidorhombus boscii*, *Sparus aurata*, *Liza aurata*, *Melanogrammus aeglefinus*, *Merluccius* spp., *Pangasius hypophthalmus*, *Scorpaena scrofa*, *Thunnus alalunga*, *Scomber scombrus*, *Lepidorhombus whiffiagonis*, *Lophius* spp., *Lates niloticus*, *Oreochromis niloticus*, *Genypterus blacodes*, *Trisopterus luscus*, *Oncorhynchus mykiss*, *Sardina pilchardus*, *Solea* spp., *Xiphias gladius*, *Galeorhinus galeus*, *Scophthalmus maximus*, *Thunnus* spp. and *Dicologlossa cuneata*. In this work, as a further step towards developing an improved detection procedure using probe-based technology, a fluorescent hybridization TaqMan

**Table 1** Real-time PCR analysis of industrial feed samples using the 12S rRNA fish-specific system

Reference	Real-time PCR results ( $C_p$ ) <sup>a</sup>		Fish meal content (%)	
	FSS	PAC	Real	Estimated
R1	24.59±0.03	10.58±0.04	0.1	0.1
R2	23.27±0.05	11.61±0.05	0.3	0.2
R3	22.07±0.00	10.68±0.00	0.5	0.6
R4	21.40±0.01	10.89±0.01	1.0	0.9
R5	20.42±0.01	11.28±0.04	1.5	1.6
R6	18.91±0.02	14.15±0.08	5.0	4.2
R7	18.65±0.03	19.39±0.02	5.0	5.2
Blind				
B1	22.69±0.01	10.98±0.02	0.5	0.4
B2	24.07±0.03	10.98±0.01	0.3	0.1
B3	20.72±0.06	11.03±0.00	1.5	1.3
B4	21.29±0.01	10.88±0.00	1.0	0.9
B5	18.96±0.03	13.45±0.01	5.0	4.0
B6	18.83±0.02	11.66±0.08	5.0	4.4
B7	16.98±0.00	11.65±0.00	100	17.7
B8	— <sup>b</sup>	10.61±0.07	0.0 (blank)	0.0
B9	14.55±0.05	14.65±0.01	100	71.4
B10	—	10.76±0.03	0.0 (blank)	0.0
B11	21.55±0.01	10.55±0.01	1.0	0.7
B12	24.90±0.05	10.13±0.02	0.1	0.1
B13	23.12±0.09	10.64±0.06	0.3	0.3
B14	22.04±0.04	11.13±0.01	0.5	0.5

FSS fish-specific system on the 12S rRNA gene (*12SpFISHDIR-12SpFISHINV* and *F12SP*), PAC positive amplification control on the 18S rRNA gene (*18SDIR/18SINV* and *18SP*)

<sup>a</sup>Average  $C_p$  value ± SD shown from triplicate PCR reactions from each DNA extraction

<sup>b</sup>Minus sign indicates no positive signal after 45 PCR cycles

oligonucleotide: *F12SP*, 5'-6FAM-AACCCCGTTNAA CCTCACC-BBQ-3' was designed to anneal within the gene fragment generated by amplification of the fish DNA target.

In addition to the fish detection scheme, different primer-s/probe systems developed previously by us for the specific detection of cattle (Pegels et al. 2011), chicken, turkey, poultry (Pegels et al. 2012a) and swine (Pegels et al. 2012b) were used for real-time PCR screening of commercial pet food products to verify the label compliance relating the species composition.

Besides the species-specific PCR systems, a conserved 18S rRNA primers/TaqMan probe combination previously reported by Pegels et al. (2011) was used as positive amplification control of the assay. Primer Express 2.0 software (Perkin-Elmer/Applied Biosystems Division, Foster City, CA, USA) was used to help on the primer design. TaqMan probes were designed and synthesized by TibMolBiol (Berlin, Germany).

#### Real-Time PCR Amplification

Real-time PCR was run under generic cycling conditions. The optimum PCR concentrations of primers yielding the highest endpoint fluorescence and the lowest crossing point value ( $C_p$ ) were 300 nM for forward primer and 900 nM for

reverse primer. The fish-specific and 18S rRNA real-time PCR reactions were carried out using the LightCycler TaqMan Master (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany), 2 pmol of each TaqMan probe (TibMolBiol), and 2 µl of extracted DNA. Amplification reactions were performed in a total reaction volume of 10 µl in a glass capillary tube and were run on the LightCycler 2.0 Instrument (Roche Applied Science, Penzberg, Germany) with the following program: 10 min at 95 °C, an amplification program of 45 cycles at 95 °C for 10 s, 55 °C for 30 s, and 72 °C for 1 s. Samples were finally cooled to 40 °C for 30 s. This program was used to amplify the fish-specific system together with the positive amplification control. Unless otherwise indicated, all real-time PCR reactions were carried out in triplicate for each DNA extract. The  $C_p$  value, which refers to the cycle number where the sample's fluorescence significantly increases above the background level, was calculated automatically by the LightCycler software as the first maximum of the second derivative of the curve.

#### Construction of the Standard Curve

To evaluate the detection limit and linear range of the fish-specific PCR system, 10-fold dilution series (in water) of DNA extracted from a mixture of fresh fish tissues from

**Table 2** Real-time PCR analysis of commercial pet food products using the 12S rRNA fish-specific system

Description of commercial pet foods				Real-time PCR results ( $C_p$ ) <sup>a</sup>		Other animal species stated in the label	
Code	Product type ( $n=4$ )	Declared fish material/content (%)		FSS	PAC	Animal species	$C_p$
F1–4	Dry dog food	Fish meal	4.0	22.04±0.01	17.45±0.07	P, B (fat)	18.37±0.02, 19.90±0.02
F5–8	Dry dog food	Fish meal	12.0	19.13±0.02	17.20±0.01	P (fat)	24.09±0.01
F9–12	Dry dog food	Fish meal	5.0	24.33±0.05	14.33±0.02	P	20.01±0.01
F13–16	Dry dog food	Ocean fish meal	NS	21.01±0.03	15.28±0.09	NS	
F17–20	Dry dog food	Sea fish meal	5.0	27.17±0.07	14.99±0.06	P	17.87±0.02
F21–24	Dry dog food	Fish meal	NS	21.06±0.02	14.78±0.03	P	18.00±0.04
F25–28	Dry dog food	Fish meal	NS	20.25±0.05	14.44±0.06	P	16.80±0.04
F29–32	Dry dog food	Fish meal	NS	21.97±0.07	15.21±0.01	P	16.06±0.02
F33–36	Dry dog food	Ocean fish meal, fish oil	4.4	23.24±0.01	16.20±0.01	C, T	19.19±0.01, 20.79±0.04
F37–40	Dry fish food	Fish meal	NS	17.33±0.04	14.06±0.00	NS	
F41–44	Dry fish food	Fish meal	NS	19.59±0.06	14.45±0.03	NS	
F45–48	Semi-moisture dog food	Fish meal	41.0	19.51±0.09	14.70±0.09	P (fat)	22.18±0.04
F49–52	Dry dog food	Fish	NS	30.15±0.09	16.59±0.02	NS	
F53–56	Dry dog food	Fish	36	18.54±0.03	14.02±0.05	P (fat)	24.69±0.08
F57–60	Dry dog food	Fish	32	20.16±0.06	16.57±0.05	P (fat)	24.30±0.04
F61–64	Canned dog food	Fish	40.1	16.11±0.09	15.24±0.00	NS	
F65–68	Canned cat food	Ocean fish	4.0	27.97±0.00	17.80±0.01	NS	
F69–72	Canned cat food	Ocean fish	4.0	28.76±0.07	20.29±0.04	NS	
F73–76	Cat food in jelly	Fish	NS	29.55±0.01	16.95±0.08	C (albumin)	26.81±0.00
F77–80	Canned cat food	Fish	24	17.75±0.04	15.63±0.02	NS	
F81–84	Dry dog food	Fish oil	NS	28.69±0.06	16.56±0.03	P	18.14±0.04
F85–88	Dry dog food	Fish oil	NS	27.63±0.01	15.35±0.01	T, P (fat)	22.44±0.13, 21.80±0.00
F89–92	Dry cat food	Fish oil	NS	26.16±0.00	21.41±0.00	P (fat)	20.68±0.09
F93–96	Canned dog food	Fish oil	0.2	– <sup>b</sup>	16.57±0.02	T	18.22±0.03
F97–100	Cat food in jelly	Fish oil	0.2	36.29±0.02	16.31±0.01	P, S	14.50±0.06, 17.21±0.08

FSS fish-specific system on the 12S rRNA gene (*12SpFISHDIR*–*12SpFISHINV* and *F12SP*), PAC positive amplification control on the 18S rRNA gene (*18SDIR*/*18SINV* and *18SP*), B bovine, C chicken, P poultry, S swine, T turkey, NS not specified

<sup>a</sup> Average  $C_p$  value ± SD shown from triplicate PCR reactions from each DNA extraction

<sup>b</sup> Minus sign indicates no positive signal after 45 PCR cycles

species of commercial interest (Atlantic halibut, mackerel, sardine, and tuna tissues) were used. For the absolute quantification approach, a standard curve was constructed using the set of reference fish meal samples (R1–R6) rendered under controlled conditions and containing increasing amounts of the target material (Table 1). The amount of target DNA in an unknown sample can be then measured by extrapolation of the  $C_p$  value obtained in the unknown sample in the corresponding standard curve of  $C_p$  values generated from known DNA percentages of the target species. In addition, the correlation between the variables,  $C_p$  and concentration ( $[ ]$ ) is semilogarithmic:

$$C_p = b \log [ ] + a$$

where  $b$  is the slope and  $a$  is the intercept.

From the slope of the standard curve, PCR amplification efficiency ( $E$ ) was calculated according to the following equation (Lee et al. 2008):

$$E = 10^{-1/\text{slope}} - 1$$

## Results and Discussion

### Real-Time PCR Set-up

Real-time PCR species identification in foods and feeds makes use, essentially, of two detection chemistries: the DNA binding dye assay using SYBR-Green as fluorophore, and the hydrolysis probe method, mainly employing

TaqMan probes. The first technology is the most basic fluorescence-based protocol and it is widely extended among researchers because it represents a cheaper alternative to approaches where the specific amplicons are detected by fluorogenic probes. However, SYBR-Green shows several limitations like its non-specific nature (it can bind to any doubled-stranded DNA that is produced during amplification), high tendency to inhibit PCR at higher dye concentration, and possible misinterpretations of DNA dissociation curves (Gašparič et al. 2010; Rojas et al. 2011). Conversely, probe-dependent real-time PCR technologies such as TaqMan assays employ, in addition to the two primers, a sequence-specific fluorescently labeled probe that confers a potentially higher assay specificity compared with methods that rely on primers alone for discrimination (Lockley and Bardsley 2000). Owing to these aspects, we report herein the use of a real-time PCR method using TaqMan probe chemistry for detection of fish DNA in farm animal feeds and pet foods. The assay is based on simplex PCR amplification of a short specific mitochondrial 12S rRNA gene fragment common to fish species and a positive amplification control based on nuclear 18S rRNA.

The specificity of the fish primer set used herein was assessed in a previous real-time PCR study based on SYBR-Green detection which was checked over a large representation of fish, mammals and bird species (Martín et al. 2010). In the present work, a third oligonucleotide (TaqMan-LNA probe) complementary to the target sequence lying between the fish-specific primers was used in an attempt to improve the overall performance of the assay, and further evaluate its applicability in a wide range of commercial feeds. Among TaqMan-based procedures, the novel type of nucleic acid analog, i.e., locked nucleic acid (LNA), represent a good alternative to other probe chemistries due to its increased thermal stability, improved hybridization specificity and opportunity for amplification of short problematic sequences (Gašparič et al. 2010). In particular, LNA probes are recommended when very small amplicons (below 100 pb) are determinant for assay success, as is the case of meals and other feed ingredients subjected to highly aggressive processing that degrade the DNA (Hird et al. 2006; Fumière et al. 2006; Prado et al. 2007).

Besides specificity, other assay performance criteria such as PCR efficiency, linear dynamic range and sensitivity are keys in the setting up of real-time PCR methods. To assess these parameters, preliminary experiments were done on 10-fold serial dilution of DNA extracted from a mixture of fresh tissues of various commercial fish species (Atlantic halibut, mackerel, sardine, and tuna) (Fig. 1). As shown in the figure, the assay was linear over the dynamic range, and a high PCR efficiency was achieved. Plus, the detection limit was 0.1 pg of fish DNA, highlighting the increased sensitivity potential of the TaqMan real-time PCR compared to

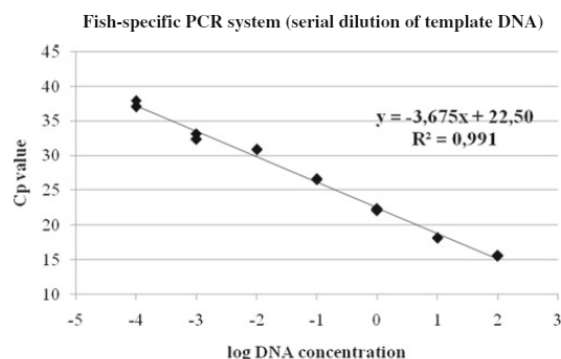


Fig. 1  $C_p$  values obtained from serial dilution series of fish DNA, plotted versus the logarithm of the DNA concentrations

previous studies based upon SYBR-Green technology (Martín et al. 2010) where the threshold was established in 10 pg.

After the initial set-up, the fish real-time PCR assay was evaluated to assess its suitability and applicability in real commercial samples (farm animal feeds and pet foods).

#### Analysis of Farm Animal Feeds

To enforce current EU legislation, it is necessary to develop analytical methods that are able to distinguish prohibited terrestrial animal material from fish-derived material, and such methods must be easy to use in different laboratories within the EU. The suitability of the TaqMan real-time PCR assay developed was firstly determined through the analysis of a batch of industrial feeds provided by Centre Wallon de Recherches Agronomiques (CRA-W, Gembloux) containing different fish meal percentages. Seven known reference samples (R1–R7) and 14 blind samples (B1–B14) were assayed with the fish-specific PCR system and the universal 18S rRNA amplification control. Once analyses were completed, the European laboratory provided us with the data on the real composition of the blind feed samples (Table 1). The fish real-time PCR system yielded a homogeneous positive fluorescence signal in all the industrial feeds declared to contain fish meal at different concentrations (from 0.1 % to 100 %) with  $C_p$  values ranging from 14.55 to 24.90, which evidences a total qualitative agreement with the real feed composition. Two blind fish-free samples (B8–B10, named as blank) were additionally included in the trial and no PCR signal was generated, supporting the ability of the assay to correctly discriminate fish-positive from fish-free feed samples. The positive detection obtained with the 18S rRNA system in all the tested industrial feeds is indicative of the presence of PCR-amplifiable eukaryotic DNA. These results demonstrated a good overall sensitivity of the

assay, achieving qualitative detection of low levels of fish meal (0.1 %) in the industrial feeds analyzed.

As a further step, the quantitative capability of the TaqMan real-time PCR method was assessed. For this aim, PCR amplification efficiency and correlation coefficient ( $R^2$ ) of the assay were calculated from a regression line of  $C_p$  values obtained from the set of reference industrial feeds provided by CRA-W containing increasing amounts of fish meals (Table 1, R1–R6). At present, there are no globally accepted performance criteria for quantification of specific DNA sequences in real-time PCR assays. The only existing guideline in the field of food analytics is the definition of the minimum performance requirements for GMO testing methods as set up by the European Network of GMO Laboratories (ENGL) (European Network of GMO Laboratories 2005). With a slope of  $-3.5$  and a correlation coefficient of  $0.98$ , the standard curve obtained in this work meets these acceptance criteria (Fig. 2). The positive correlation observed between the fluorescence values and the target DNA concentrations suggests that the real-time PCR technique operated with a constant efficiency and, therefore, has the potential for quantitative determination of small fish meal percentages. Table 1 shows, together with the average  $C_p$  values obtained in the 14 blind industrial feeds, the correspondence between the real fish DNA content (percentage declared by the provider) and the value estimated (detected) for these samples in the real-time PCR assay, using the standard curve equation. As can be seen, an average good agreement is accomplished, except for sample B7 containing 100 % of pure fish meal. Quantification discordance in these feeds may be due to their high fish DNA concentration, which would be outside the linear dynamic range of the standard curve constructed.

A number of works have argued the constraints and sources of uncertainty associated to precise PAPs quantification in feeds by real-time PCR methodologies (Benedetto et al. 2011; Martín et al. 2010; Prado et al. 2012). Notably,

the sample matrix type, DNA extraction process and target degradation resulting from processing can greatly affect DNA yield and quality, being the main critical factors when evaluating quantitative real-time PCR measurements. In the context of the present analyses, it should be noted that information about the matrix composition and processing conditions of the fish meals was unspecified. However, the overall concordance between the estimated and the real fish meal content of the blind samples bring to assume that their characteristics were homogeneous and similar to the reference meals. This suggests that quantification of the target DNAs by means of the fish real-time PCR method reported would theoretically be possible, as long as the samples analyzed had matrix features and processing treatment comparable to the reference samples. Nonetheless, this may not be the case of routine trial analyses of unknown (commercial) feeds, where the heterogeneous tissue-types and ingredients that can be present, together with the different processing treatments applied to the raw materials/ingredients, may lead to measurement uncertainties and quantification ambiguity of the real-time PCR method.

Another determinant issue in quantitative real-time PCR approaches is the selection of an appropriate DNA target to perform the analyses. In general, mitochondrial DNA is the most extended marker for genetic studies aimed at species authentication (Lockley and Bardsley 2000) because it offers certain advantages over nuclear DNA. Furthermore, and in particular with reference of fish-focused assays, most of the few real-time PCR methods described up to now for detection and quantification of fish-derived material in feeds also rely on the use of mitochondrial DNA sequences (Benedetto et al. 2011; Martín et al. 2010). However, as already mentioned, the different tissues and, consequently, different numbers of mitochondria and mtDNA present in fish makes quantification difficult as discussed by other authors (Fumière et al. 2009; Martín et al. 2009). As an alternative to mitochondrial-based assays, the work by Prado et al. (2012) has recently evaluated a novel real-time PCR approach using a single-copy nuclear DNA for simultaneous detection and quantification of several commercial fish species. Although the quantitative potential of the method was demonstrated for each individual fish species targeted, these authors conclude that the applicability of the real-time PCR for the quantification of several fish DNAs without knowing its origin needs to be investigated further, due to the high variation among the different fish species that may simultaneously be present in a feed (Prado et al. 2012).

In the present work, the mitochondrial genome DNA (mt DNA) was chosen as target because, still with the mentioned quantification limitations, it significantly increases the sensitivity of the PCR assay compared with nuclear genome, which is of special interest in the analysis of feed matrices

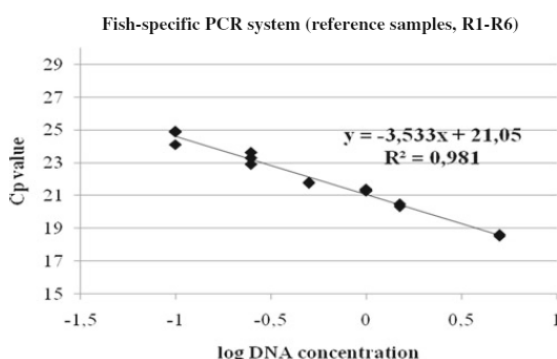


Fig. 2  $C_p$  values obtained from reference samples, plotted versus the logarithm of the DNA concentrations

that undergo degradation due to the severe processing conditions applied in the rendering plants (Fumière et al. 2006). The results obtained in the present work indicate that the real-time PCR assay reported allows rapid, sensitive and simultaneous detection of the fish species most frequently used in the feed sector. However, DNA standards for each target would be required to achieve precise quantitative results, which is not feasible from a practical standpoint. In agreement with other researchers, accurate quantification of fish-derived material in feedstuffs remains a questionable threat (Benedetto et al. 2011; Martín et al. 2010; Prado et al. 2012).

#### Analysis of Pet Foods

Besides control measures applied to farm animal feeds, a related traceability concern of European authorities is related to the use of animal by-products for manufacturing pet foods. To comply with legislation, pet food labels must indicate either all the ingredients present in the product, or the categories to which the ingredients belong, and should be transparent, consistent, coherent and understandable (EC767/2009). Therefore, the reported TaqMan real-time PCR assay was applied to analyze 100 commercial dog, cat and fish food products labeled to contain different fish materials as ingredients, i.e., fish meal, fish and fish oil (Table 2). Such ingredients are categorized in current European legislation as suitable fish-derived products commonly used in animal feed formulations (EC575/2011). The pet feed products analyzed in this work were formulated as dry, semi-moist and canned depending on the processing methods used by producers. As can be deduced from Table 2, the fish real-time PCR system successfully detected the presence of fish materials in 96 out of 100 (96 %) of the processed feeds declaring to contain fish ingredients in their labels. Four different batches from each pet food sample type were analyzed, with no significant variability observed in the  $C_p$  values. The detected fish content ranged from 0.2 % to 40.1 %, with samples of unknown fish percentage (denoted as NS in the table). Also, the 18S rRNA system yielded a straightforward and homogeneous positive signal in all the tested samples, indicating the presence of amplifiable DNA. The feeds showing disagreeing results were F93 to F96, which declared to contain fish oil (0.2 %) but did not yield a positive detection fluorescence signal with the fish real-time PCR system. This result might be ascribed either to the absence of fish oil in these samples, suggesting a possible labeling fraud, or to the lower DNA amount/integrity present in the fish oil matrix compared to that of the meals, as consequence of the processing treatments applied to the raw material to separate the fats from the solids (fat-free dry matter) and the water. The later assumption would be particularly evident in samples containing such low

amount (0.2 %) of target. These observations are consistent with other works reporting failure or decrease in PCR detectability in lipid matrices from commercial products of different origins (Costa et al. 2012), bringing special attention to the importance of choosing adequate inhibitor-free DNA purification methods, as well as assay design on small length DNA fragments. In this same line, a late  $C_p$  value of 36.29 was achieved for samples F97 to F100, also labeled to contain a low amount (0.2 %) of fish oil, evidencing the particular difficulty of amplifying the fish oil matrix. It should be noted that other pet feeds containing non-specified (NS) percentages of fish oil were successfully detected in the real-time PCR assays (F81 to F92), suggesting the presence of higher fish oil contents in these samples.

In addition to the experiments conducted to evaluate the presence of fish-derived ingredients in the pet feeds, commercial samples declaring to contain additional species in their labels (cattle, chicken, poultry, swine and turkey) were also tested with the four corresponding species-specific PCR assays developed by our group (Pegels et al. 2011, 2012a, b) in order to corroborate the labeling information. In all the samples analyzed, the results obtained were in accordance with the species composition stated on the labels (Table 2).

Although still scarce, there is some published work focused on detection of fish ingredients in farm animal feeds by means of real-time PCR assays (Benedetto et al. 2011; Martín et al. 2010; Prado et al. 2012). Surprisingly, much less attention is paid to the detection of fish in commercial pet food products. The PCR assays developed by Dalmaso et al. (2004) and Ioja-Boldura et al. (2011) were applied to the analysis of different feeds including pet foods, for the identification of several animal species commonly processed at the rendering plants. However, the assays involve some limitations compared with the present study, such as the reduced number of fish species targeted, the limited representation of commercial samples tested, and the use of conventional or end point PCR as detection platform. To our knowledge, this is the first real-time PCR approach applied to the authentication of fish-derived ingredients in a realistic sampling of commercial pet feeds, which adds a practical dimension to the work.

As occurs with farm animal feeds, we should remark that quantitative analysis of pet feeds is also unattainable from a pragmatic perspective. Although the quantitative application is restricted, the real-time PCR technique reported in this work has shown the ability to sensitively detect the DNA from different fish species normally employed in the formulation of feeds.

#### Conclusions

Considering the importance of fish authentication for food and feed processors, regulatory authorities and consumers,

different analytical methodologies have been proposed over the past years to reveal fraud and for enforcement purposes. In particular, the reported real-time PCR method allowed qualitative and sensitive detection of various fish-derived materials (fish, fish meal and fish oil) in a wide assortment of farm animal feeds and pet food products. Although precise quantification of fish material in feedstuffs was not feasible under field conditions, the real-time PCR method developed allows qualitative detection of low percentages of fish material in animal feeds, down to 0.1 % level. The assay can be applied by producers and food safety authorities as a complementary tool for the surveillance of regulatory labeling requirements, therefore contributing to protect the authenticity and traceability of food and assure consumer's rights.

**Acknowledgments** The authors are indebted to Dr. O. Fumière from Centre-Wallon de Recherches Agronomiques (CRA-W), Belgium for kindly providing us with the industrial feed samples analyzed in this study. This work was supported by the Programa de Vigilancia Sanitaria 2009/AGR/1489 of the Comunidad de Madrid (Spain) and by a project (AGL2010/15279) from the Ministerio de Ciencia e Innovación (Spain). Nicolette Pegels is recipient of a fellowship from the Ministerio de Educación (Spain). Inés López-Calleja is recipient of a Juan de la Cierva grant from the Ministerio de Ciencia e Innovación (Spain).

## References

- Ali ME, Hashim U, Dhahi TS, Mustafa S, Che-Man YB, Latif MA (2012) Analysis of pork adulteration in commercial burgers targeting porcine-specific mitochondrial cytochrome *b* gene by TaqMan probe real-time polymerase chain reaction. *Food Anal Method* 5:784–794
- Asensio L (2007) PCR-based methods for fish and fishery products authentication. *Trends Food Sci Technol* 18:558–566
- Benedetto A, Abete MC, Squadrone S (2011) Towards a quantitative application of real-time PCR technique for fish DNA detection in feedstuffs. *Food Chem* 126:1436–1442
- Chiappini B, Brambilla G, Agrimi U, Vaccari G, Aarts HJM, Berben G, Domenico Frezza D, Giambra V (2005) Real-time PCR approach for quantitation ruminant-specific DNA to indicate a correlation between DNA amount and meat and bone meal heat treatments. *J AOAC Int* 88:1399–1403
- Costa J, Mafra I, Beatriz M, Oliveira PP (2012) Advances in vegetable oil authentication by DNA-based markers. *Trends Food Sci Technol* 26:43–55
- Dalmasso A, Fontanella E, Piatti P, Civera T, Rosati S, Bottero MT (2004) A multiplex PCR assay for the identification of animal species in feedstuffs. *Mol Cell Probes* 18:81–87
- EC1224/2009 (2009) Commission regulation (EC) 1224/2009 of 20 November 2009 establishing a Community control system for ensuring compliance with the rules of the common fisheries policy, amending Regulations (EC) No 847/96, (EC) No 2371/2002, (EC) No 811/2004, (EC) No 768/2005, (EC) No 2115/2005, (EC) No 2166/2005, (EC) No 388/2006, (EC) No 509/2007, (EC) No 676/2007, (EC) No 1098/2007, (EC) No 1300/2008, (EC) No 1342/2008 and repealing Regulations (EEC) No 2847/93, (EC) No 1627/94 and (EC) No 1966/2006. *Off J Euro Commun* L343:1–50
- EC142/2011 (2011) Commission regulation (EC) 142/2011 of 25 February 2011 implementing Regulation (EC) No 1069/2009 laying down health rules as regards animal by-products and derived products not intended for human consumption and implementing Council Directive 97/78/EC as regards certain samples and items exempt from veterinary checks at the border under that Directive. *Off J Euro Commun* L54:1–254
- EC575/2011 (2011) Commission regulation (EC) 575/2011 of 16 June 2011 on the catalogue of feed materials. *Off J Euro Commun* L159:25–65
- EC767/2009 (2009) Commission regulation (EC) 767/2009 of 13 July 2009 on the placing on the market and use of feed, amending European Parliament and Council Regulation (EC) No 1831/2003 and repealing Council Directive 79/373/EEC, Commission Directive 80/511/EEC, Council Directives 82/471/EEC, 83/228/EEC, 93/74/EEC, 93/113/EC and 96/25/EC and Commission Decision 2004/217/EC. *Off J Euro Commun* L229:1–28
- EC999/2001 (2001) Commission regulation (EC) 999/2001 of 22 May 2001 laying down rules for the prevention, control and eradication of certain transmissible spongiform encephalopathies. *Off J Euro Commun* L147:1–205
- Espy MJ, Uhl JR, Sloan LM, Buckwalter SP, Jones MF, Vetter EA, Yao JDC, Wengenack NL, Rosenblatt JE, Cockerill FR III, Smith TF (2006) Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. *Clin Microbiol Rev* 19:165–256
- European Network of GMO Laboratories (2005) Definition of minimum performance requirements for analytical methods of GMO testing. <http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/guidanceocs.htm> (accessed Sep 10, 2012)
- Fumière O, Dubois M, Baeten V, von Holst C, Berben G (2006) Effective PCR detection of animal species in highly processed animal byproducts and compound feeds. *Anal Bioanal Chem* 385:1045–1055
- Fumière O, Veys P, Boix A, von Holst C, Baeten V, Berben G (2009) Methods of detection, species identification and quantification of processed animal proteins in feedingstuffs. *Biotechnol Agron Soc* 13:59–70
- Gašparič MB, Tengs T, la Paz JL, Holst-Jensen A, Pla M, Esteve M, Žel J, Gruden K (2010) Comparison of nine different real-time PCR chemistries for qualitative and quantitative applications in GMO detection. *Anal Bioanal Chem* 396:2023–2029
- Goffaux F, China B, Dams L, Clinquart A, Daube G (2005) Development of a genetic traceability test in pig based on single nucleotide polymorphism detection. *Forensic Sci Int* 151:239–247
- Hird H, Chisholm J, Sánchez A, Hernández M, Goodier R, Schneede K, Boltz C, Popping B (2006) Effect of heat and pressure processing on DNA fragmentation and implications for the detection of meat using a real-time polymerase chain reaction. *Food Addit Contam A* 23:645–650
- Ioja-Boldura OM, Popescu S, Bruznică S, Hutu I (2011) Applicability of a multiplex PCR assay for the identification of animal species in feedstuffs. *Bull UASVM Animal Scie Bio* 68(1–2)
- Lee C, Lee S, Shin SG, Hwang S (2008) Real-time PCR determination of rRNA gene copy number: absolute and relative quantification assay with *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol* 78:371–376
- Lockley AK, Bardsley RG (2000) DNA-based methods for food authentication. *Trends Food Sci Technol* 11:67–77
- Martín I, García T, Fajardo V, Rojas M, Pegels N, Hernández PE, González I, Martín R (2009) SYBR-Green real-time PCR approach for the detection and quantification of pig DNA in feedstuffs. *Meat Sci* 82:252–259
- Martín I, García T, Rojas M, Pegels N, Pavón MA, Hernández PE, González I, Martín R (2010) Real-time polymerase chain reaction detection of fishmeal in feedstuffs. *J AOAC Int* 93:1768–1777

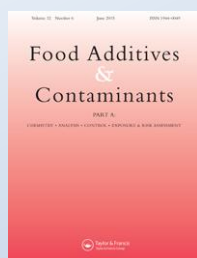
- Pegels N, González I, Martín I, Rojas M, García T, Martín R (2011) Applicability assessment of a real-time PCR assay for the specific detection of bovine, ovine and caprine material in feedstuffs. *Food Control* 22:1189–1196
- Pegels N, González I, López-Calleja I, Fernández S, García T, Martín R (2012a) Evaluation of a TaqMan real-time PCR assay for detection of chicken, turkey, duck, and goose material in highly processed industrial feed samples. *Poult Sci* 91:1709–1719
- Pegels N, González I, Fernández S, García T, Martín R (2012b) Sensitive detection of porcine DNA in processed animal proteins using TaqMan real-time PCR assay. *Food Addit Contam A* 29:1402–1412
- Prado M, Fumière O, Boix A, Marien A, Berben G, von Holst C (2007) Detection of ruminant meat and bone meals in animal feed by real-time polymerase chain reaction: result of an interlaboratory study. *J Agr Food Chem* 55:7495–7501
- Prado M, Boix A, von Holst C (2012) Novel approach for the simultaneous detection of DNA from different fish species based on a nuclear target: quantification potential. *Anal Bioanal Chem* 403:3041–3050
- Rojas M, González I, Pavón MA, Pegels N, Hernández PE, García T, Martín R (2011) Application of a real-time PCR assay for the detection of ostrich (*Struthio camelus*) mislabelling in meat products from the retail market. *Food Control* 22:523–531
- Teletchea F (2009) Molecular identification methods of fish species: reassessment and possible applications. *Rev Fish Biol Fish* 19:265–293
- Wild LG, Lehrer SB (2005) Fish and shellfish allergy. *Curr Allergy Asthm Rep* 5:74–79
- Zhou QC, Zhao J, Li P, Wang HL, Wang LG (2011) Evaluation of poultry by-product meal in commercial diets for juvenile cobia (*Rachycentron canadum*). *Aquaculture* 322–323:122–127





#### III.1.4. OTHER ANIMAL SPECIES

**Detection of rabbit and hare processed material in compound feeds by TaqMan real-time PCR.**



**Food Additives and Contaminants**  
*Volume 30, pages 771-779, 2013*

**Market analysis of food and feed products for detection of horse DNA by a TaqMan real-time PCR.**



**Food Analytical Methods**  
*Volume 8, pages 489-498, 2015*



## Detection of rabbit and hare processed material in compound feeds by TaqMan real-time PCR

N. Pegels, I. López-Calleja, T. García, R. Martín and I. González\*

*Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain*

(Received 21 December 2012; final version received 7 April 2013)

Food and feed traceability has become a priority for governments due to consumer demand for comprehensive and integrated safety policies. In the present work, a TaqMan real-time PCR assay targeting the mitochondrial 12S rRNA gene was developed for specific detection of rabbit and hare material in animal feeds and pet foods. The technique is based on the use of three species-specific primer/probe detection systems targeting three 12S rRNA gene fragments: one from rabbit species, another one from hare species and a third fragment common to rabbit and hare (62, 102 and 75 bp length, respectively). A nuclear 18S rRNA PCR system, detecting a 77-bp amplicon, was used as positive amplification control. Assay performance and sensitivity were assessed through the analysis of a batch of laboratory-scale feeds treated at 133°C at 3 bar for 20 min to reproduce feed processing conditions dictated by European regulations. Successful detection of highly degraded rabbit and hare material was achieved at the lowest target concentration assayed (0.1%). Furthermore, the method was applied to 96 processed commercial pet food products to determine whether correct labelling had been used at the market level. The reported real-time PCR technique detected the presence of rabbit tissues in 80 of the 96 samples analysed (83.3%), indicating a possible labelling fraud in some pet foods. The real-time PCR method reported may be a useful tool for traceability purposes within the framework of feed control.

**Keywords:** real-time PCR; 12S rRNA gene; rabbit; hare; leporids; animal feeds; pet foods; traceability

### Introduction

During the last few years, growing attention has been paid to the traceability and labelling of processed food in which the discrimination of different ingredients is difficult (Woolfe & Primrose 2004; Montowska & Pospiech 2011). The compound feed industry, including farm animal feed and pet food sectors, represents a key segment of the food chain where traceability schemes are evolving rapidly. In the case of farm animal feed, the use of processed animal proteins (PAPs) is controlled within the European Union through several regulations aimed at avoiding the spread of bovine spongiform encephalopathy and other diseases. Among these, the introduction of a total ban on the use of PAPs for any animal farmed for the production of food (European Commission 2003) is the main health protection measure against bovine spongiform encephalopathy. Hence, any presence of prohibited constituents of animal origin in feed is considered a breach of the feed ban, and, therefore, detection of such constituents in feedstuffs is a prime need (Dalmaso et al. 2004).

Likewise, the pet food sector may also be subject of fraudulent activities, affecting the quality and safety of its products and damaging consumers' confidence. Authentication at this level is thus important, considering that pet food has become one of the fastest growing products in world trade, representing about 80% of the global pet industry market (De Silva & Turchini 2008). In

2009, the European Union established Regulation 2009/767/EC on the placing on the market and use of feed, which explicitly refers that "pet food labels must indicate either all the ingredients present in the product or the categories to which the ingredients belong, and should be transparent, consistent, coherent and understandable" (European Commission 2009a). Such harmonisation was set up because pet food manufacturers have often followed internal company guidelines because of the lack of European regulations on how label information should be provided to the customer. Proving conclusively that fraud has occurred therefore requires the verification of the species information printed on the feed labels, in compliance with legislation.

Efficient methodologies for species authentication in processed foods and feeds are pivotal, with a number of molecular approaches being developed in the last few years (Pereira et al. 2010). Among the four types of biomolecules (i.e., proteins, lipids, carbohydrates and nucleic acids), DNA has been reported as the most appropriate biomarker to identify the source of animal-derived materials (Ali et al. 2012). One of the main reasons is the stability of DNA under the conditions associated with the treatments used in the food and feed industry, such as high temperatures and pressure. In particular, mitochondrial DNA is the most extended marker for genetic studies aimed at species authentication in food and feed

\*Corresponding author. Email: [gonzalzi@vet.ucm.es](mailto:gonzalzi@vet.ucm.es)

(Lockley & Bradsley 2000; Pereira et al. 2008; Fajardo et al. 2010). Because the mitochondrial genome is a high copy number target, it significantly increases the sensitivity of the PCR technique, and this is of special interest in the analysis of feed matrices that undergo degradation due to the severe processing conditions applied in the rendering plants (Fumière et al. 2006). In addition, mitochondrial DNA has a relatively high mutation rate (10 times greater than that of nuclear DNA), allowing the discrimination of closely related species (La Neve et al. 2008). Among the numerous DNA-based analytical protocols that have emerged in the last decade, amplification of specific DNA sequences by means of the PCR is presently the most widely used approach for species assignment in food and feed (Frezza et al. 2008; Fumière et al. 2009). Real-time PCR provides automated high-throughput detection of amplified DNA with the progress of reaction, with the help of a reporter dye (Ali et al. 2012). In particular, probe-based chemistries such as TaqMan real-time PCR assays permit the use of very small amplicons, which are especially suited for the detection of degraded DNA. These assays use dual-labelled hybridisation probes that will bind only to the desired specific sequence within the amplicon and can therefore amplify specifically and efficiently, mainly when enhanced sensitivity is required (Bellagamba et al. 2006; Benedetto et al. 2011; Pegels et al. 2011).

The aim of this study was to develop a TaqMan real-time PCR approach for the specific identification of rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) and hare (*Lepus capensis*) tissues in processed animal feeds and pet foods, based on three primer/probe detection systems designed upon short mitochondrial 12S rRNA gene sequences: a rabbit-PCR system, a hare-PCR system and a third system common to both species (referred to as the leporids-PCR system). The applicability of the assay was evaluated through the analysis of a set of laboratory-scale binary feed mixtures plus a wide representation of commercial pet food products.

## Material and methods

### Sample selection and DNA extraction

Authentic tissues from rabbit (*Oryctolagus cuniculus*), cape hare (*Lepus capensis*) and other animal and plant species from different origins were obtained from retail markets, local abattoirs or the Veterinary Hospital (Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain). Samples were morphologically identified by trained veterinarians when needed, and transported to the laboratory under refrigeration.

Experimental binary mixtures of rabbit, cape hare and rabbit plus cape hare (1:1 w/w) in an oat matrix were prepared by using heat-treated muscle tissues from the selected species. For each mixture, different percentages

ranging from 25% to 0.1% (w/w) of the target species were prepared to a final weight of 100 g. Forty millilitres of sterile PBS (136 mM NaCl, 1.4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 8.09 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O and 2.6 mM KCl, pH 7.2) was added to the binary mixtures, and they were homogenised with a blender (Sunbeam Oster, Delray Beach, FL, USA). Target animal tissues were processed in an autoclave (133°C at 3 bar for 20 min) in compliance with the legal requirement for animal offal in rendering plants (European Commission 2009b). Temperature was checked by introducing a temperature data logger in the autoclave, together with the muscle. Heat-treated binary mixtures were processed directly or stored at -20°C until used.

A total of 96 commercial dog and cat food products of distinct brands and characteristics, labelled to contain "rabbit" ingredients, were purchased from several retail markets and pet shops (Table 3).

Genomic DNA was obtained from 200 mg of each test sample by using the Wizard DNA Clean-up System kit (Promega, Madison, WI, USA) as described by Pegels et al. (2011). The DNA was eluted in 100 µL of sterile deionised water, and its concentration was measured with a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Inc., Montchanin, DE, USA). Unless otherwise stated, three DNA replicates were extracted from each sample. A negative control sample was included in every DNA extraction.

### Primers and probes design

The oligonucleotides used in the real-time PCR assay were designed on the basis of mitochondrial 12S rRNA and nuclear 18S rRNA gene sequences from various animal and plant species available in the National Center for Biotechnology Information database.

Alignment and computer analysis of mitochondrial 12S rRNA sequences allowed the design of rabbit (*R12SDIR/R12SNV*) and hare (*H12SDIR/H12SINV*) specific primer pairs for the amplification of DNA fragments of 62 and 102 bp, respectively. In the case of the primer pairs targeting hare, which involve several species of the genus *Lepus*, the assay was designed on the basis of the 12S rRNA gene sequences of two of the most abundant and largest distributed species: cape hare (*Lepus capensis*) (accession number FM164770) and brown hare (*Lepus europaeus*) (accession number AJ421471). For the common detection of rabbit and hare species (referred to as leporids), a pair of primers was designed in the 12S rRNA gene (*L12SDIR/L12SINV*) to obtain a DNA product of 75 bp. Primer Express 2.0 software (Perkin-Elmer/Applied Biosystems Division, Foster City, CA) was used to help with the primer design.

Apart from the three specific primer pairs, two TaqMan probes (named as *RH12SP* for rabbit and hare, and *L12SP* for leporids) were designed to anneal within



Table 1. DNA sequences and description of the primers and probes.

	Length (bp)	Sequence (5'→3')	Description	Target gene	Fragment length (bp)
<b>Primers</b>					
<i>R12SDIR</i>	21	GTAAGCTCAATTACCACCGTA	Rabbit-specific forward primer	12S rRNA	62
<i>R12SINV</i>	18	ATTGCTCTCCACTCTATG	Rabbit-specific reverse primer		
<i>H12SDIR</i>	26	TATAAGTAAGCTTAATCATCACCATA	Hare-specific forward primer	12S rRNA	102
<i>H12SINV</i>	18	GCTTCCGTGTGTTCTAAA	Hare-specific reverse primer		
<i>L12SDIR</i>	23	AACAATAAGCTGTAAAAAGTAA	Leporids-specific forward primer	12S rRNA	75
<i>L12SINV</i>	20	TGAGTTCGAAGGGTATAAAA	Leporids-specific reverse primer		
<b>Probes</b>					
<i>RH12SP</i>	15	FAM- AAACGTTAGGTCAAG-BBQ	Rabbit/hare probe	12S rRNA	
<i>L12SP</i>	19	FAM-CACTTTCGTYGTTTAT TTTGTGTTGCA-BBQ	Leporids probe	12S rRNA	

the gene fragment generated by the amplification of the corresponding target, and were labelled on the 5' end with the fluorescent reporter dye 6-carboxyfluorescein and on the 3' end with the blackberry fluorescent quencher. TaqMan probes were designed and synthesised by TibMolBiol (Berlin, Germany). Besides, a conserved 18S rRNA primer/TaqMan probe combination previously reported by Pegels et al. (2011) was used as positive amplification control of the assay. The sequences and description of every primer and probe designed in this study are listed in Table 1.

In addition to the assays focused on leporid species, different real-time PCR systems developed previously for the specific detection of cattle, lamb (Pegels et al. 2011), swine (Pegels, González, Fernández et al. 2012), chicken, turkey (Pegels, González, López-Calleja et al. 2012b), fish (Pegels et al. Forthcoming 2013) and deer (Fajardo et al. 2008) were used for the screening of commercial pet food products to verify the label compliance related to animal species composition.

#### Real-time PCR amplification

Real-time PCR was run under generic cycling conditions. The optimum PCR concentrations of primers yielding the highest endpoint fluorescence and the lowest crossing point value ( $C_p$ ) were 300 nM for the forward primer and 900 nM for the reverse primer. The real-time PCR reactions were carried out by using the LightCycler TaqMan Master (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany), 2 pmol of each TaqMan probe (TibMolBiol) and 2 µL of extracted DNA. Amplification reactions were performed in a total reaction volume of 10 µL in a glass capillary tube and were run on the LightCycler 2.0

Instrument (Roche Applied Science, Penzberg, Germany) with the following program: 10 min at 95°C, an amplification program of 50 cycles at 95°C for 10 s, 55°C for 30 s and 72°C for 1 s. Samples were finally cooled to 40°C for 30 s. This program was used to amplify the species-specific systems together with the positive amplification control. Unless otherwise indicated, all real-time PCR reactions were carried out in triplicate for each DNA extract. The  $C_p$  value, which refers to the cycle number where the sample's fluorescence significantly increases above the background level, was calculated automatically by the LightCycler software as the first maximum of the second derivative of the curve.

#### Construction of the standard curve

To evaluate the detection limit and linear range of the species-specific PCR systems, 10-fold dilution series (in water) of DNA extracted from rabbit, cape hare and a mixture of rabbit plus cape hare tissues (1:1 w/w) were used. Besides, three standard curves were constructed by using the set of reference binary mixtures (muscle/oat) containing 0.1%, 1%, 5%, 10% and 25% from the corresponding target tissues processed at 133°C at 3 bar for 20 min. DNA extracts were amplified in triplicate for each percentage, and the amplification curve was created by plotting the logarithm of the DNA concentration ( $[ ]$ ) against the  $C_p$  values. The correlation between the variables,  $C_p$  and concentration is semilogarithmic:

$$C_p = b \log[ ] + a$$

where  $b$  is the slope and  $a$  is the intercept.

From the slope of the standard curve, PCR amplification efficiency ( $E$ ) was calculated according to the following equation (Lee et al. 2008):

$$E = 10^{-1/\text{slope}} - 1$$

## Results and discussion

### Real-time PCR set up

In this work, a real-time PCR assay was developed for the detection of rabbit and hare material in animal feeds, based on three primer/probe systems (rabbit, hare and leporids PCR systems) targeting the 12S rRNA

mitochondrial gene. The family *Leporidae*, consisting primarily of rabbits and hares, includes 11 genera and approximately 56 species (Chapman & Flux 1990). The European rabbit can be distinguished from the hares by a suite of distinctive differences, covering development and behaviour, as well as morphology (Corbet 1986). With respect to meat characteristics, rabbit meat is white and more tender than hare meat, which is darker and has a stronger gamey flavour (Lebas et al. 1997).

For accurate species identification by PCR, specificity is a prerequisite. In the present work, the specificity of each real-time PCR system was verified against a wide number of animal and plant species commonly used in the food and feed industry, including 41 species of mammals, birds, fish and plants. As shown in Table 2, the real-time

Table 2. Specificity of the real-time PCR systems.

Common name	Scientific name	RSS	HSS	LSS	PAC
Rabbit	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	11.96 ± 0.01 <sup>a</sup>	— <sup>b</sup>	15.90 ± 0.01	13.32 ± 0.02
Cape hare	<i>Lepus capensis</i>	—	9.31 ± 0.00	17.64 ± 0.03	11.13 ± 0.01
Cattle	<i>Bos taurus</i>	—	—	—	10.36 ± 0.02
Sheep	<i>Ovis aries</i>	—	—	—	10.16 ± 0.01
Goat	<i>Capra hircus</i>	—	—	—	12.21 ± 0.01
Swine	<i>Sus scrofa domestica</i>	—	—	—	12.43 ± 0.08
Horse	<i>Equus caballus</i>	—	—	—	12.63 ± 0.02
Cat	<i>Felis catus</i>	—	—	—	13.54 ± 0.06
Dog	<i>Canis familiaris</i>	—	—	—	14.05 ± 0.01
Rat	<i>Rattus norvegicus</i>	—	—	—	14.36 ± 0.08
Red deer	<i>Cervus elaphus</i>	—	—	—	12.01 ± 0.02
Roe deer	<i>Capreolus capreolus</i>	—	—	—	11.88 ± 0.03
Fallow deer	<i>Dama dama</i>	—	—	—	13.91 ± 0.02
Chicken	<i>Gallus gallus</i>	—	—	—	13.13 ± 0.00
Turkey	<i>Meleagris gallopavo</i>	—	—	—	10.59 ± 0.01
Duck	<i>Anas platyrhynchos</i> × <i>Cairina moschata</i>	—	—	—	12.61 ± 0.04
Goose	<i>Anser anser</i>	—	—	—	12.12 ± 0.01
Quail	<i>Coturnix coturnix</i>	—	—	—	10.43 ± 0.03
Pheasant	<i>Phasianus colchicus</i>	—	—	—	12.21 ± 0.05
Partridge	<i>Alectoris rufa</i>	—	—	—	11.01 ± 0.01
Guinea fowl	<i>Numida meleagris</i>	—	—	—	13.62 ± 0.09
Ostrich	<i>Struthio camelus</i>	—	—	—	11.44 ± 0.06
Sardine	<i>Sardina pilchardus</i>	—	—	—	11.72 ± 0.04
Tuna	<i>Thunnus atlanticus</i>	—	—	—	11.57 ± 0.09
Trout	<i>Salmo fario</i>	—	—	—	10.61 ± 0.05
Monk fish	<i>Lophius piscatorius</i>	—	—	—	11.02 ± 0.02
Red mullet	<i>Mullus barbatus</i>	—	—	—	12.91 ± 0.02
Nile perch	<i>Perca fluviatilis</i>	—	—	—	10.62 ± 0.01
Barley	<i>Hordeum vulgare</i>	—	—	—	12.43 ± 0.07
Maize	<i>Zea mays</i>	—	—	—	14.01 ± 0.09
Oat	<i>Avena sativa</i>	—	—	—	11.70 ± 0.00
Soybean	<i>Glycine max</i>	—	—	—	11.53 ± 0.09
Rye	<i>Secale cereale</i>	—	—	—	11.90 ± 0.01
Wheat	<i>Triticum aestivum</i>	—	—	—	12.62 ± 0.08
Sunflower	<i>Helianthus annuus</i>	—	—	—	11.14 ± 0.02
Rice	<i>Oryza sativa</i>	—	—	—	13.58 ± 0.07
Nut	<i>Juglans regia</i>	—	—	—	14.02 ± 0.05
Pistachio	<i>Pistacia vera</i>	—	—	—	12.42 ± 0.03

(continued)

Table 2. Continued.

Common name	Scientific name	RSS	HSS	LSS	PAC
Almond	<i>Prunus amygdalus</i>	—	—	—	11.91 ± 0.02
Pine nut	<i>Pinus pinea</i>	—	—	—	12.25 ± 0.06
Peanut	<i>Arachis hypogaea</i>	—	—	—	12.22 ± 0.00
Hazelnut	<i>Corylus avellana</i>	—	—	—	11.11 ± 0.03

Notes: 12S rRNA RSS, rabbit-specific system on the 12S rRNA gene (*R12SDIR/R12SINV* and *RH12SP*); 12S rRNA HSS, hare-specific system on the 12S rRNA gene (*H12SDIR/H12SINV* and *RH12SP*); 12S rRNA LSS, leporids-specific system on the 12S rRNA gene (*L12SDIR/L12SINV* and *L12SP*); 18S rRNA PAC, positive amplification control on the 18S rRNA gene (*18SDIR/18SINV* and *18SP*).

<sup>a</sup>Average  $C_p$  value ± SD shown from triplicate PCR reactions from each DNA extraction.

<sup>b</sup>Minus sign indicates no positive signal after 50 PCR cycles.

PCR systems designed for rabbit, hare and leporids positively detected their corresponding target tissues, while no amplification signal was obtained on the non-target animal and plant species tested, meeting the desired PCR specificity requirements. The 18S rRNA system showed a straightforward positive detection signal from all eukaryotic samples analysed, evidencing the presence of amplifiable DNA in the samples.

Besides specificity, other assay performance criteria such as linear dynamic range, PCR efficiency and sensitivity are keys in the setting up of real-time PCR methods (Bustin et al. 2009). To assess these parameters, preliminary experiments were done on 10-fold serial dilution of DNA extracted from processed rabbit, cape hare and rabbit-cape hare mixture (1:1 w/w) (Figure 1). As shown in the figure, linearity was observed for the three PCR systems (rabbit, hare and leporids) over 5 orders of magnitude, and a high PCR efficiency was achieved. The detection limit of the assays was 0.01 ng/μL of each target DNA. This value refers to the lowest concentration of target DNA producing reliably detected fluorescence signals.

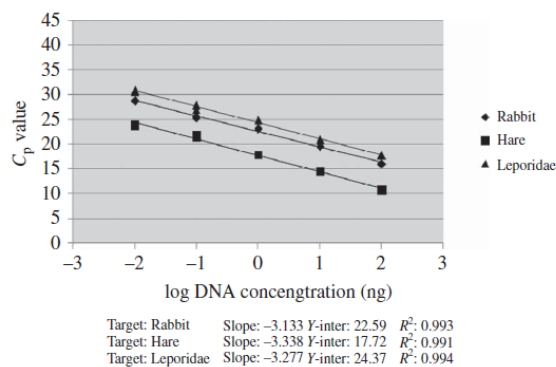


Figure 1.  $C_p$  values obtained from serial dilution series of rabbit, cape hare and leporids DNA, plotted versus the logarithm of the DNA concentrations.

#### Analysis of experimental feed binary mixtures

A critical factor in PCR analysis is the degradation of DNA subsequent to the industrial treatments applied to certain products, as is the case of meals and feed ingredients subjected to highly aggressive processing (Fumière et al. 2006; Hird et al. 2006; Prado et al. 2007). Hence, the real-time PCR assay was firstly evaluated through three batches of experimental mixtures (muscle/oat) from rabbit, hare and leporids containing from 25% to 0.1% processed tissues, reproducing the characteristics of the large-scale industrial processes applied to feeds. It should be noted that laboratory-scale prepared samples were used at this point because feeds containing leporid by-products were not available from the searched European laboratories that manufacture reference industrial PAPs for feeds species analysis.

Results showed successful target detection for each reference sample array tested (rabbit, hare and leporids), even at the lowest concentration levels assayed (0.1%) (Figure 2). As shown in the figure, the resulting theoretical slopes of the rabbit (2a), hare (2b) and leporids (2c) standard curves showed values that were near to the slope's value of -3.32, corresponding to a 100% PCR efficiency in each cycle and a correlation coefficient of at least 0.98 in all the standard curves. The results obtained suggest that the real-time PCR technique operated with a constant efficiency and has the potential to detect small amounts of rabbit and hare highly processed materials.

In the context of transmissible spongiform encephalopathies eradication program, analytical methods capable of allowing species-specific identification in PAPs are required to comply with European Union regulations (European Commission 2003). In addition, it is worth mentioning that a recent study has evidenced that rabbits, which have been classified as resisting transmissible spongiform encephalopathies for four decades, are no longer resistant to prion infection (Chianini et al. 2012), although these authors suggest that an outbreak of "mad rabbit disease" is to date unlikely. In any case, the fact that



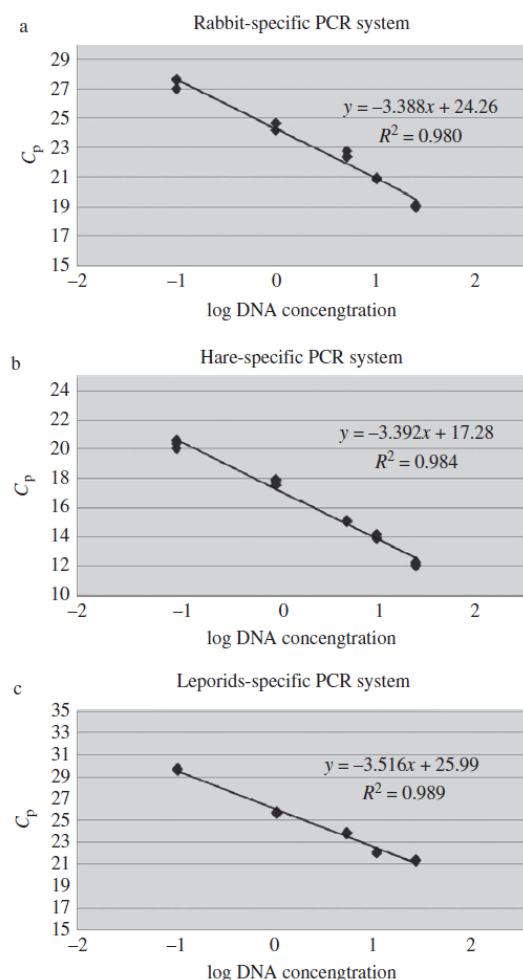


Figure 2.  $C_p$  values obtained from reference binary mixtures, plotted versus the logarithm of the DNA concentrations.

leporids are abundant in wild populations occurring worldwide, and are commercially reared for food and feed production (Chianini et al. 2012), enhances the significance of the developed real-time PCR method.

#### Analysis of pet foods

The application of molecular methods also plays an important role in species identification of transformed products such as cat and dog meals, where frauds have to be avoided or recognised (Teletchea et al. 2005). In this sector, new formulations using diverse value-added commodities including meats from leporid species such as rabbits and hares have been gaining in popularity as ingredients in products such as gourmet pet foods and/or hypoallergenic formulas (Combelles 2004; Rojas et al.

2011). Rabbit and hare meat products are highly appreciated because of their dietary properties: the meat is lean and has lower fat content and less saturated fatty acids and cholesterol than other meats. Therefore, such products are prone to be fraudulently substituted by others containing less valued animal tissues or ingredients (Peiretti 2012; Santos et al. 2012).

In this part of the work, the TaqMan real-time PCR assay was applied to 96 commercial dog and cat food products of different types (canned, appetisers, jelly, dry, pâté and semi-moist) labelled to contain “rabbit” among other ingredients. As shown in Table 3, the rabbit-specific real-time PCR system detected the presence of rabbit material in 80 out of 96 (83.3%) processed pet foods declaring to contain this species in their labels. Four different batches from each pet food sample type were analysed, with no significant variability observed in the  $C_p$  values. The detected rabbit content ranged from 1% to 50%, with samples of unknown rabbit percentage (denoted as NS in the table). Likewise, the leporids real-time PCR system reported a successful detection in all tested samples, except for those not detected with the rabbit-specific real-time PCR system, corroborating the previous results obtained. As can be deduced from the table, the 16 samples showing disagreeing results were Cn1–Cn8 and Cn89–Cn96, which declared containing amounts of rabbit ranging from 5% to 100% but did not yield any positive fluorescence signal with either the rabbit or the leporids real-time PCR systems. This result suggests a possible fraud due to labelling misdescription in these pet food products.

Regarding the hare-specific PCR system, none of the market samples gave a positive detection signal, in consonance with the absence of “hare” ingredients in the label composition description provided by the suppliers. Although pet foods containing hare components were not found at the market, limiting the practical application of the hare-specific PCR system to such products, it should be reminded that hare binary feed mixtures heated at 133°C were sensitively detected with the corresponding hare-specific real-time PCR system (Figure 2), indicating the high potential of the technique to detect low levels of processed hare material in food and feed. Besides, the 18S rRNA system yielded a straightforward and homogeneous positive signal in all the tested samples, evidencing the presence of amplifiable DNA.

Apart from the experiments conducted to evaluate the presence of rabbit-derived ingredients in the pet foods, samples were tested with other species-specific PCR assays developed in previous works for deer, turkey, cattle, chicken, fish, swine and lamb detection (Fajardo et al. 2008, 2013; Pegels et al. 2011; Pegels, González, Fernández et al. 2012; Pegels, González, López-Calleja et al. 2012), to provide a more complete verification of the labelling information. Each sample was analysed with

Table 3. Results of the analysis of commercial pet food products.

Labelling description of commercial pet food products				Real-time PCR results ( $C_p$ ) <sup>a</sup>				
Code	Product type ( <i>n</i> = 4)	Declared animal species	Rabbit content (%)	RSS	HSS	LSS	PAC	Other non-leporid species detected/ $C_p$ <sup>a</sup>
Cn1-4	Canned cat food	R, D	33	– <sup>b</sup>	–	–	16.56 ± 0.02	C (24.20 ± 0.03)
Cn5-8	Canned cat food	R, T	33	–	–	–	15.83 ± 0.02	C, T (16.62 ± 0.02, 30.79 ± 0.09)
Cn9-12	Canned cat food	R	NS	19.67 ± 0.05	–	19.78 ± 0.03	20.78 ± 0.09	–
Cn13-16	Canned cat food	R, B	15	22.64 ± 0.03	–	23.53 ± 0.05	19.16 ± 0.00	B (14.65 ± 0.02)
Cn17-20	Canned cat food	R	50	22.13 ± 0.04	–	23.86 ± 0.03	15.35 ± 0.02	–
Cn21-24	Canned cat food	R, B, C	5	31.39 ± 0.03	–	30.99 ± 0.29	19.99 ± 0.03	B, C (16.31 ± 0.01, 16.81 ± 0.06)
Cn25-28	Canned cat fillets	R, C	27	25.22 ± 0.09	–	25.58 ± 0.02	19.39 ± 0.03	C (17.32 ± 0.07)
Cn29-32	Canned dog food	R	NS	18.69 ± 0.06	–	19.12 ± 0.00	16.18 ± 0.06	–
Cn33-36	Canned dog food	R, T	20	20.85 ± 0.05	–	21.76 ± 0.07	16.57 ± 0.02	T (18.22 ± 0.03)
Cn37-40	Canned meat and liver	R	10	21.09 ± 0.14	–	21.81 ± 0.01	15.97 ± 0.02	–
Cn41-44	Cat appetisers	R, T	5	32.19 ± 0.22	–	33.68 ± 0.03	18.54 ± 0.01	T (25.35 ± 0.02)
Cn45-48	Cat appetisers	R, C, Pn	4	25.84 ± 0.03	–	26.72 ± 0.01	17.23 ± 0.03	C, Pn (18.57 ± 0.01, 23.62 ± 0.03)
Cn49-52	Cat food in jelly	R, C, F	4	30.14 ± 0.12	–	31.57 ± 0.09	16.95 ± 0.08	C, F (26.81 ± 0.00, 29.56 ± 0.01)
Cn53-56	Cat food in jelly	R, L	4	21.92 ± 0.09	–	22.54 ± 0.01	15.37 ± 0.09	L (15.88 ± 0.09)
Cn57-60	Cat food in jelly	R, P, Pn, F	4	20.94 ± 0.04	–	23.00 ± 0.05	16.31 ± 0.01	C, Pn, F (14.50 ± 0.06, 17.21 ± 0.08, 36.69 ± 0.15)
Cn61-64	Dry cat food	R, P, F	NS	32.13 ± 0.21	–	32.15 ± 0.10	21.41 ± 0.00	C, F (24.09 ± 0.09, 19.17 ± 0.05)
Cn65-68	Dry cat food	R	NS	32.36 ± 0.07	–	33.46 ± 0.04	19.41 ± 0.06	–
Cn69-72	Dry dog food	R	NS	30.44 ± 0.02	–	30.65 ± 0.01	13.23 ± 0.06	–
Cn73-76	Dry dog food	R	NS	30.29 ± 0.06	–	31.51 ± 0.02	19.30 ± 0.06	–
Cn77-80	Dry dog food	R, P, F, B	4	28.30 ± 0.01	–	29.41 ± 0.05	17.45 ± 0.07	C, F, B (18.37 ± 0.02, 22.09 ± 0.07, 19.90 ± 0.03)
Cn81-84	Dry dog food	R, F, P	1	32.69 ± 0.02	–	33.01 ± 0.02	20.20 ± 0.01	F, C (26.18 ± 0.03, 20.68 ± 0.09)
Cn85-88	Pâté cat food	R	4	23.17 ± 0.02	–	23.12 ± 0.03	18.45 ± 0.09	–
Cn89-92	Pâté cat food	R	5	–	–	–	16.54 ± 0.02	C (20.13 ± 0.03)
Cn93-96	Semi-moist dog food	R	100	–	–	–	15.47 ± 0.00	C (17.79 ± 0.05)

Notes: RSS, rabbit-specific system on the 12S rRNA gene (*R12SDIR/R12SINV* and *RH12SP*); HSS, hare-specific system on the 12S rRNA gene (*H12SDIR/H12SINV* and *RH12SP*); LSS, leporids-specific system on the 12S rRNA gene (*L12SDIR/L12SINV* and *L12SP*); PAC, positive amplification control on the 18S rRNA gene (*18SDIR/18SINV* and *18SP*).

B, bovine; C, chicken; D, deer; F, fish; L, lamb; NS, not specified; P, poultry; Pn, porcine; R, rabbit; T, turkey.

<sup>a</sup>Average  $C_p$  value ± SD shown from triplicate PCR reactions from each DNA extraction.

<sup>b</sup>Minus sign indicates no positive signal after 50 PCR cycles.

the PCR systems corresponding to the non-leporid species declared in the labels (Table 3). In all the pet food products analysed, the results obtained were in agreement with the species composition stated on the labels, except Cn1–Cn4, which declared containing deer ingredients, while the PCR assay classified this batch as negative for this game species.

As a further labelling assessment, the 16 pet foods yielding a negative PCR signal with the rabbit and the leporid PCR systems (Cn1–Cn8 and Cn89–Cn96) were screened with the real-time PCR systems developed for chicken (Pegels, González, López-Calleja et al. 2012) and porcine (Pegels, González, Fernández et al. 2012) to determine whether less expensive and more easily available meats could have been processed and marketed instead of rabbit in these samples. As can be seen in Table 3, a positive fluorescence signal was achieved in the 16 samples when using the chicken-specific PCR system (with  $C_p$  values ranging from 16 to 24), evidencing the fraudulent incorporation of less expensive poultry tissues in these products.

The vast majority of PCR applications for species identification in foods and feeds published to date are focused on domestic species such as cattle, ruminants, pig or poultry (Teletchea et al. 2005; Fajardo et al. 2010). However, minor attention is paid to the detection of less commonly consumed species such as rabbits and hares (Santos et al. 2012). Among the few published PCR approaches focused on rabbit detection, Martín et al. (2009) and Bottero et al. (2003) achieved PCR identification of this species in processed animal meals. However, both assays use endpoint PCR as the detection platform, which is correlated with a lower sensitivity compared with real-time PCR and requires post-PCR processing steps. Moreover, to our knowledge, no reports are available to date focused on real-time PCR detection of rabbit- and hare-derived ingredients in commercial pet feeds. Concerning hare species detection, the number of works available in the literature up to now is even scarcer, with no published studies dealing with processed feeds. Santos et al. (2012) developed a real-time PCR assay to authenticate hare meats, but the method restricts the analysis to raw tissues, limiting its application to processed food and feed. This work reports, for the first time, the detection of rabbit and hare material in a representative sampling of animal feeds and pet foods, demonstrating its suitability to sensitively detect undeclared ingredients in highly processed samples.

### Conclusions

The real-time PCR method developed has been proved to fulfil the requirements in terms of specificity and sensitivity for the identification of rabbit and hare material in highly degraded matrices. The results showed that this

method can be useful for the qualitative detection of low amounts of leporid-based ingredients in animal food and feed formulations. The real-time PCR protocol herein developed can be performed in inspection programmes for verifying labelling and traceability regulations within the food/feed sector.

### Acknowledgements

This work was supported by the Programa de Vigilancia Sanitaria 2009/AGR/1489 of the Comunidad de Madrid (Spain) and by a project (AGL2010/15279) from the Ministerio de Ciencia e Innovación (Spain). Nicolette Pegels is recipient of a fellowship from the Ministerio de Educación (Spain). Inés López-Calleja is recipient of a Juan de la Cierva grant from the Ministerio de Ciencia e Innovación (Spain).

### References

- Ali ME, Kashif M, Uddin K, Hashim U, Mustafa S, Che Man YB. 2012. Species authentication methods in foods and feeds: the present, past, and future of halal forensics. *Food Anal Methods*. 5:935–955. doi: 10.1007/s12161-011-9357-3.
- Bellagamba F, Comincini S, Ferretti L, Valfre F, Moretti VM. 2006. Application of quantitative real-time PCR in the detection of prion-protein gene species-specific DNA sequences in animal meals and feedstuffs. *J Food Prot.* 69:891–896.
- Benedetto A, Abete MC, Squadrone S. 2011. Towards a quantitative application of real-time PCR technique for fish DNA detection in feedstuffs. *Food Chem.* 126:1436–1442.
- Bottero MT, Dalmasso A, Nucera D, Turi RM, Rosati S, Squadrone S, Goria M, Civera T. 2003. Development of a PCR assay for the detection of animal tissues in ruminant feeds. *J Food Prot.* 66:2307–2312.
- Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL, et al. 2009. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem.* 55:611–622.
- Chapman JA, Flux JEC. 1990. Rabbits, hares and pikas: Status survey and conservation action plan. Gland: IUCN.
- Chianini F, Fernández-Borges N, Vidal E, Gibbard L, Pintado B, de Castro J, Priola SA, Hamilton S, Eaton SL, Finlayson J, et al. 2012. Rabbits are not resistant to prion infection. *Proc Natl Acad Sci USA.* 109:5080–5085.
- Combelles E. 2004. The premiumisation of private label in pet food. London: Euromonitor International Plc.
- Corbet GB. 1986. Relationships and origins of the European lagomorphs. *Mammal Rev.* 16:105–110.
- Dalmasso A, Fontanella E, Piatti P, Civera T, Rosati S, Bottero MT. 2004. A multiplex PCR assay for the identification of animal species in feedstuffs. *Mol Cell Probes.* 18:81–87.
- De Silva SS, Turchini GM. 2008. Towards understanding the impacts of the pet food industry on world fish and seafood supplies. *J Agric Environ Ethics.* 21:459–467.
- European Commission. 2003. Commission Regulation 2003/1234/EC of 10 July 2003 amending annexes I, IV and XI to Regulation 2001/999/EC of the European Parliament and of the Council and Regulation 2000/11326/EC as regards transmissible spongiform encephalopathies and animal feeding. *Off J Eur Commun.* L 173:6–13.
- European Commission. 2009a. Commission Regulation 2009/767/EC of 13 July 2009 on the placing on the market and



- use of feed, amending European Parliament and Council Regulation (EC) No 1831/2003 and repealing Council Directive 79/373/EEC, Commission Directive 80/511/EEC, Council Directives 82/471/EEC, 83/228/EEC, 93/74/EEC, 93/113/EC and 96/25/EC and Commission Decision 2004/217/EC. Off J Eur Commun. L 229:1–28.
- European Commission. 2009b. Commission Regulation 2009/1069/EC of 21 October 2009 laying down laying down health rules as regards animal by-products and derived products not intended for human consumption and repealing Regulation (EC) No 1774/2002 (Animal by-products Regulation). Off J Eur Commun. L 300:1–33.
- Fajardo V, González I, Martín I, Rojas M, Hernández PE, García T, Martín R. 2008. Real-time PCR for detection and quantification of red deer (*Cervus elaphus*), fallow deer (*Dama dama*), and roe deer (*Capreolus capreolus*) in meat mixtures. Meat Sci. 79:289–298.
- Fajardo V, González I, Rojas M, García T, Martín R. 2010. A review of current PCR-based methodologies for the authentication of meats from game animal species. Trends Food Sci Technol. 21:408–421.
- Frezza D, Giambra V, Chegiani F, Fontana C, Maccabiani G, Losio N, Faggionato E, Chiappini B, Vaccari G, von Holst C, et al. 2008. Standard and Light-Cycler PCR methods for animal DNA species detection in animal feedstuffs. Innov Food Sci Emerg Technol. 9:18–23.
- Fumière O, Dubois M, Baeten V, von Holst C, Berben G. 2006. Effective PCR detection of animal species in highly processed animal byproducts and compound feeds. Anal Bioanal Chem. 385:1045–1054.
- Fumière O, Veys P, Boix A, von Holst C, Baeten V, Berben G. 2009. Methods of detection, species identification and quantification of processed animal proteins in feedingstuffs. Biotechnol Agron Soc Environ. 13:59–70.
- Hird H, Chisholm J, Sánchez A, Hernández M, Goodier R, Schneede K, Boltz C, Popping B. 2006. Effect of heat and pressure processing on DNA fragmentation and implications for the detection of meat using a real-time polymerase chain reaction. Food Addit Contam A. 23:645–650.
- La Neve F, Civera T, Mucci N, Bottero MT. 2008. Authentication of meat from game and domestic species by SNaPshot minisequencing analysis. Meat Sci. 80:216–224.
- Lebas F, Coudert P, de Rochambeau H, Thébault RG. 1997. The rabbit: husbandry, health and production. FAO Animal Production and Health Series No. 21, Rome: FAO. Available from: <http://www.fao.org/docrep/t1690e/t1690e00.HTM>.
- Lee C, Lee S, Shin SG, Hwang S. 2008. Real-time PCR determination of rRNA gene copy number: absolute and relative quantification assay with *Escherichia coli*. Appl Microbiol Biotechnol. 78:371–376.
- Lockley AK, Bardsley RG. 2000. DNA-based methods for food authentication. Trends Food Sci Technol. 11:67–77.
- Martín I, García T, Fajardo V, Rojas M, Pegels N, Hernández PE, González I, Martín R. 2009. Polymerase chain reaction detection of rabbit DNA in food and animal feed. World Rabbit Sci. 17:27–34.
- Montowska M, Pospiech E. 2011. Authenticity determination of meat and meat products on the protein and DNA basis. Food Rev Int. 27:84–100.
- Pegels N, González I, Fernández S, García T, Martín R. 2012. Sensitive detection of porcine DNA in processed animal proteins using TaqMan real-time PCR assay. Food Addit Contam A. 29:1402–1412.
- Pegels N, González I, López-Calleja I, Fernández S, García T, Martín R. 2012. Evaluation of a TaqMan real-time PCR assay for detection of chicken, turkey, duck, and goose material in highly processed industrial feed samples. Poultry Sci. 91:1709–1719.
- Pegels N, González I, López-Calleja I, García T, Martín R. Forthcoming 2013. Detection of fish-derived ingredients in animal feeds by a TaqMan real-time PCR assay. Food Anal Methods. doi:10.1007/s12161-012-9555-7.
- Pegels N, González I, Martín I, Rojas M, García T, Martín R. 2011. Applicability assessment of a real-time PCR assay for the specific detection of bovine, ovine and caprine material in feedstuffs. Food Contr. 22: 1189–1196.
- Peiretti PG. 2012. Effects of dietary fatty acids on lipid traits in the muscle and perirenal fat of growing rabbits fed mixed diets. Animals. 2:55–67.
- Pereira F, Cameiro J, Amorim A. 2008. Identification of species with DNA-based technology: current progress and challenges. Recent Pat DNA Gene Seq. 2:187–200.
- Pereira F, Cameiro J, Matthiesen R, van Asch B, Pinto N, Gusmao L, Amorim A. 2010. Identification of species by multiplex analysis of variable-length sequences. Nucleic Acids Res. 38:e203. doi:10.1093/nar/gkq865.
- Prado M, Berben G, Fumière O, van Duijn G, Mensinga-Kruize J, Reaney S, Boix A, von Holst C. 2007. Detection of ruminant meat and bone meals in animal feed by real-time polymerase chain reaction: result of an interlaboratory study. J Agric Food Chem. 55:7495–7501.
- Rojas M, González I, de la Cruz S, Hernández PE, García T, Martín R. 2011. Application of species-specific polymerase chain reaction assays to verify the labeling of quail (*Coturnix coturnix*), pheasant (*Phasianus colchicus*) and ostrich (*Struthio camelus*) in pet foods. Anim Feed Sci Technol. 169:128–133.
- Santos CG, Melo VS, Amaral JS, Estevinho L, Oliveira MBPP, Mafra I. 2012. Identification of hare meat by a species-specific marker of mitochondrial origin. Meat Sci. 90:836–841.
- Teletchea F, Maudet C, Hänni C. 2005. Food and forensic molecular identification: update and challenges. Trends Biotechnol. 23:359–366.
- Woolfe M, Primrose S. 2004. Food forensics: using DNA technology to combat misdescription and fraud. Trends Biotechnol. 22:222–226.

## Market Analysis of Food and Feed Products for Detection of Horse DNA by a TaqMan Real-Time PCR

Nicolette Pegels · Teresa García · Rosario Martín · Isabel González

Received: 5 February 2014 / Accepted: 10 June 2014 / Published online: 24 June 2014  
© Springer Science+Business Media New York 2014

**Abstract** Food-labelling regulations require that meat species in food and feed are accurately declared to the consumer. Traceability systems based on species identification through DNA analysis are potent tools for the supervision of food adulteration. In this study, a TaqMan real-time polymerase chain reaction (PCR) assay targeting a short mitochondrial 12S ribosomal RNA (rRNA) gene fragment of 73 base pair (bp) was developed for detection of horse DNA in different commercial meat products for human and pet consumption. The method was found to be specific for horse and did not show any cross-reactivity with different species of mammals, birds, fish and plants. The assay complies with the acceptance criteria required for real-time PCR methods in terms of applicability, linear dynamic range, accuracy and PCR efficiency and showed to be sensitive allowing the detection of 1 pg of horse DNA. A range of food and feed products ( $n=171$ ) was screened with the horse-specific real-time PCR to determine whether a correct labelling had been employed at the market level. Results obtained when testing the meat products for human consumption were in agreement with the labelling description provided by the suppliers. In the case of the pet foods, undeclared horse meat was detected in 21 % of the samples at low levels, suggesting unintentional cross-contamination during processing. The reported real-time PCR methodology may represent a suitable tool for the detection of food mislabelling.

**Keywords** 12S rRNA gene · TaqMan real-time PCR · Horse · Human and pet foods · Traceability

### Introduction

The quality, safety and authenticity of food and feed are of principle interest for society and strictly regulated by legislation (Nader et al. 2013; EC/178/2002). However, because labels do not provide sufficient guarantee about the true contents of a product, it is necessary to identify and/or authenticate its components, thus protecting both consumers and producers from illegal substitutions.

Protection from falsely labelled processed foods that may contain unknown, exotic, less desirable or objectionable meat species is demanded, not only for health reasons (i.e. susceptible individuals may suffer from allergies caused by unknown meat proteins) (Meyer and Candrian 1996) but also for economic reasons. In this context, a recent issue regarding fraudulent labelling came to light in early 2013 when The Food Safety Authority of Ireland (FSAI) revealed the presence of low levels of undeclared horse DNA in some beef burger products, a fact that was initially attributable to unintentional cross-contamination along meat-processing facilities (O'Mahony 2013). However, in the months that followed, a significant list of meat products and ready-made meals was found to contain varying levels of undeclared horse meat, revealing a major breakdown in the traceability of the food chain. A coordinated control plan was subsequently launched in the European Union (EU) to establish the prevalence of fraudulent practices in the marketing of certain foods, and the results reported the presence of unlabelled horse meat in an overall of approximately 5 % of the tested products (EU/99/2013; European Commission 2013). Although not directly linked to a health risk, the “horse meat scandal”, as it is known, is an example of a food fraud incident that has led to increased concern and mistrust on the authenticity of food regarding the illegal presence of animal species not declared as such in the ingredient list (Cawthorn et al. 2013).

N. Pegels · T. García · R. Martín · I. González (✉)  
Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain  
e-mail: gonzalzi@vet.ucm.es

The misdescription of product contents on the labels can occur not only in foods for human consumption but also in feedingstuffs destined to animals, where frauds should also be controlled and avoided. To comply with legislation, pet food labels must indicate either all the ingredients present in the product or the categories to which the ingredients belong and should be transparent, consistent, coherent and understandable (EC/767/2009).

In the last years, a number of molecular approaches for food and feed species authentication have been developed, broadly based on detecting species-specific proteins or DNA (Pereira et al. 2010). Methods based on DNA analysis are the most renowned tools for this purpose because DNA offers the advantage of being a relatively stable molecule at high temperatures (Woolfe and Primrose 2004; Cawthraw et al. 2009). This feature favours the analysis not only of fresh and frozen food products but also of processed, degraded and mixed ones (Lenstra 2003). Analysis of DNA coupled with polymerase chain reaction (PCR) is considered to be a fast, sensitive and highly specific solution for the detection of minute amounts of one species or a group of species, since PCR technology is based on the exponential amplification of a sequence of target DNA (Soares et al. 2013; Prado et al. 2013). The most recent reports have focused on the use of the real-time PCR format for species identification based on nucleic acid molecules (Montowska and Pospiech 2011), due to its higher sensitivity and specificity, larger dynamic range of detection, easy automation and less carry-over contamination risk (Kesmen et al. 2012; Yusop et al. 2012). In particular, real-time PCR using TaqMan probe chemistry represents a good alternative when specific and sensitive detection of very small-sized DNA fragments is required, which is the case of processed food and feed products (Ballin et al. 2012; Huber et al. 2013).

Considering all these aspects, the aim of this study was the development of a TaqMan real-time PCR for the specific identification of horse (*Equus caballus*) DNA and its further application to evaluate the authenticity of different meat-based products for human and pet consumption prevailing on the Spanish local market.

## Material and Methods

### Sample Selection and DNA Extraction

The large number of animal and plant ingredients that can be included in compound feedingstuffs means that any diagnostic technique should be tested for cross-reactivity against a wide range of species from different origins to avoid false positives. In this work, authentic tissues from horse (*E. caballus*) and other animal species were obtained from retail markets, local slaughterhouses or from The Veterinary Hospital (Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense

de Madrid, Spain) (Table 1). Authenticity of animal tissues was confirmed by trained veterinarians upon morphological characteristics of an entire animal. Fresh tissue portions from the selected specimens were cut into small pieces and stored frozen at  $-20^{\circ}\text{C}$  until use. Additionally, a wide range of plant species samples were also included in the specificity tests.

Experimental reference binary mixtures of horse muscle tissues ranging from 25 to 0.1 % (wt/wt) in an animal matrix (bovine muscle) were prepared to a final weight of 100 g. Forty millilitres of sterile PBS (136 mM NaCl, 1.4 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 8.09 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  and 2.6 mM KCl, pH 7.2) was added to the binary mixtures, and they were homogenized with a blender (Sunbeam Oster, FL, USA). Fifty grams of each mixture was processed in an autoclave ( $121^{\circ}\text{C}$  for 20 min) to check the ability of the technique to identify the target in highly processed products. Temperature was checked by introducing a temperature data logger in the autoclave, together with the muscle. Heat-treated binary mixtures were processed directly or stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until used.

A total of 171 commercial meat-based products from distinct brands and characteristics (81 of them destined for human consumption and 90 for dogs and cats) were purchased from different Spanish retail markets and pet shops. Sample testing included an evaluation of products declaring to contain horse as ingredient (alone or together with other animal species), as well as foods that did not list this species on their labels (Tables 3 and 4).

Genomic DNA was extracted from 200 mg of each test sample and purified using the Wizard DNA Clean-up System kit (Promega, Madison) as described by Pegels et al. (2011). The DNA was eluted in 100  $\mu\text{L}$  of sterile deionized water, and its concentration was measured with a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies Inc., Montchanin, USA). The purity of the DNA extract was evaluated based on the ratio of the absorbance at 260 and 280 nm, and values between 1.7 and 2.0 were obtained. Unless otherwise stated, three DNA replicates were extracted from each sample. A negative control sample was included in every DNA extraction.

### Primers and Probe Design

The oligonucleotides used in the horse-specific real-time PCR assay were designed on the basis of mitochondrial 12S ribosomal RNA (rRNA) gene sequences from various animal and plant species available in the National Center for Biotechnology Information (NCBI) database. They consisted of a forward primer designed by us (*Hr12SDIR* 5'-GCCCTTGGGATGGAGAGA-3') and a reverse primer previously described by our group (Martín et al. 2009) (*Hr12SNV* 5'-GAGACTTTCGTCCGGGTAAAGT-3'), for the amplification of horse-specific DNA fragments of 73 bp. Primer Express 2.0 software (Perkin-Elmer/Applied Biosystems Division, Foster

**Table 1** Specificity of the real-time PCR system

Common name	Scientific name	Hr.S.S	P.A.C
Horse	<i>Equus caballus</i>	16.62±0.01 <sup>a</sup>	13.62±0.07
Donkey	<i>Equus asinus</i>	–	11.76±0.04
Cattle	<i>Bos taurus</i>	–	10.69±0.01
Sheep	<i>Ovis aries</i>	–	10.24±0.01
Goat	<i>Capra hircus</i>	–	12.05±0.08
Swine	<i>Sus scrofa domestica</i>	–	12.07±0.04
Rabbit	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	–	12.04±0.02
Cape hare	<i>Lepus capensis</i>	–	13.96±0.01
Cat	<i>Felis catus</i>	–	14.70±0.08
Dog	<i>Canis familiaris</i>	–	14.08±0.08
Rat	<i>Rattus norvegicus</i>	–	12.18±0.05
Red deer	<i>Cervus elaphus</i>	–	11.68±0.03
Roe deer	<i>Capreolus capreolus</i>	–	13.90±0.02
Fallow deer	<i>Dama dama</i>	–	13.34±0.00
Chicken	<i>Gallus gallus</i>	–	10.31±0.09
Turkey	<i>Meleagris gallopavo</i>	–	12.69±0.06
Duck	<i>Anas platyrhynchos</i> x <i>Cairina moschata</i>	–	12.32±0.03
Goose	<i>Anser anser</i>	–	10.04±0.03
Quail	<i>Coturnix coturnix</i>	–	12.06±0.06
Pheasant	<i>Phasianus colchicus</i>	–	11.12±0.09
Partridge	<i>Alectoris rufa</i>	–	13.19±0.02
Guinea fowl	<i>Numida meleagris</i>	–	11.04±0.08
Ostrich	<i>Struthio camelus</i>	–	11.14±0.01
Sardine	<i>Sardina pilchardus</i>	–	11.15±0.09
Tuna	<i>Thunnus atlanticus</i>	–	10.91±0.05
Trout	<i>Salmo fario</i>	–	11.93±0.07
Monk fish	<i>Lophius piscatorius</i>	–	12.43±0.02
Red mullet	<i>Mullus barbatus</i>	–	10.76±0.03
Nile perch	<i>Perca fluviatilis</i>	–	12.17±0.00
Barley	<i>Hordeum vulgare</i>	–	14.51±0.01
Maize	<i>Zea mays</i>	–	11.41±0.07
Oat	<i>Avena sativa</i>	–	11.28±0.01
Soybean	<i>Glycine max</i>	–	11.04±0.06
Rye	<i>Secale cereale</i>	–	12.11±0.01
Wheat	<i>Triticum aestivum</i>	–	11.02±0.02
Sunflower	<i>Helianthus annuus</i>	–	13.19±0.08
Rice	<i>Oryza sativa</i>	–	14.85±0.01
Nut	<i>Juglans regia</i>	–	12.50±0.03
Pistachio	<i>Pistacia vera</i>	–	11.33±0.03
Almond	<i>Prunus amygdalus</i>	–	12.81±0.05
Pine nut	<i>Pinus pinea</i>	–	12.13±0.00
Peanut	<i>Arachis hypogaea</i>	–	11.11±0.06
Hazelnut	<i>Corylus avellana</i>	–	13.01±0.04

<sup>a</sup> Average C<sub>p</sub> value±SD shown from triplicate PCR reactions from each DNA extraction

Minus sign indicates no positive signal after 50 PCR cycles

Hr.S.S horse-specific system on the 12S rRNA gene (*Hr12SDIR*/*Hr12SINV* and *H12SP*)

Positive amplification control on the 18S rRNA gene (*18SDIR*/*18SINV* and *18SP*)

City, CA) was used to assist on the primer design. Apart from the specific primers, one TaqMan probe *H12SP*, 5'-6FAM-CTTGTTCTTAGGGTAGAAA-BBQ-3', was designed to anneal within the gene fragment generated by amplification of the target and was labelled on the 5' end with the fluorescent reporter dye 6-carboxyfluorescein (FAM) and on the 3' end with the blackberry fluorescent quencher (BBQ). The TaqMan probe was designed and synthesized by TibMolBiol (Berlin, Germany). Besides, a conserved 18S rRNA primers/TaqMan probe combination previously reported by Pegels et al. (2011) was used as positive amplification control of the assay.

In addition to the assays focused on horse detection, different real-time PCR systems developed previously by our group for the specific detection of cattle, lamb (Pegels et al. 2011), swine (Pegels et al. 2012a), chicken, turkey (Pegels et al. 2012b), fish (Pegels et al. 2013a) and rabbit (Pegels et al. 2013b) were used for screening of the commercial human food and pet feed products in order to verify the label compliance related to animal species composition.

#### Real-Time PCR Amplification

Real-time PCR was run under generic cycling conditions. The optimum PCR concentrations of primers yielding the highest endpoint fluorescence and the lowest crossing point value (C<sub>p</sub>) were 300 nM for forward primer and 900 nM for reverse primer. The real-time PCR reactions were carried out using the LightCycler TaqMan Master (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany), 2 pmol of each TaqMan probe (TibMolBiol) and 2 µL (100 ng) of extracted DNA. Amplification reactions were performed in a total reaction volume of 10 µL in a glass capillary tube and were run on the LightCycler 2.0 Instrument (Roche Applied Science, Penzberg, Germany) with the following program: 10 min at 95 °C, an amplification program of 50 cycles at 95 °C for 10 s, 55 °C for 30 s and 72 °C for 1 s. Samples were finally cooled to 40 °C for 30 s. This program was used to amplify the species-specific systems together with the positive amplification control. Unless otherwise indicated, all real-time PCR reactions were carried out in triplicate for each DNA extract. Negative and positive control extracts were included in each PCR run. The C<sub>p</sub> value, which refers to the cycle number where the sample's fluorescence significantly increases above the background level, was calculated automatically by the LightCycler software as the first maximum of the second derivative of the curve.

#### Construction of the Standard Curve

To evaluate the detection limit and linear range of the species-specific PCR systems, a standard curve was constructed using ten-fold dilution series (in water) containing 50, 5, 0.5, 0.05, 0.005 and 0.0005 ng/µL of DNA extracted from horse muscle

tissue. Besides, the set of heat-treated (121 °C at 3 bar for 20 min) horse/beef muscle binary mixtures containing 0.1, 1, 5, 10 and 25 % of the target species was also used. In both sets of experiments (ten-fold DNA dilutions and tissue reference binary mixtures), DNA extracts were amplified in triplicate for each concentration, and the amplification curve was created by plotting the logarithm of the target concentration against the  $C_p$  values.

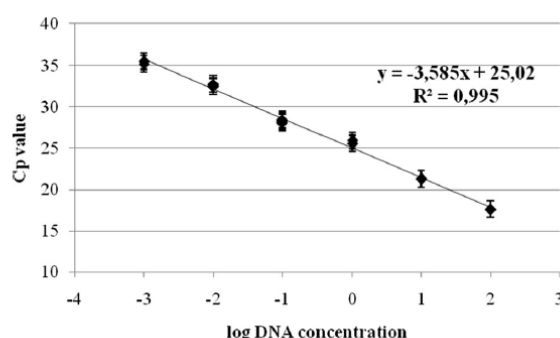
In order to ensure confidence that the real-time PCR assay performs consistently and reliably when implemented in an analysis setting, validation of the developed method was carried out following the “Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments (MIQE)” guidelines for the publication of real-time PCR experiments suggested by Bustin et al. (2009), also considering the requirements set by the European Network of GMO Laboratories (ENGL) document: “Definition of Minimum Performance Requirements for Analytical Methods of Genetically Modified Organism (GMO) Testing (Phase one)”, used for the validation of methods for GMO analysis (European Network of GMO Laboratories 2008).

## Results and Discussion

### Real-Time PCR Set-Up

In this work, a real-time PCR assay based on selective amplification of a short mitochondrial 12S rRNA gene fragment was developed for the detection of horse DNA in meat products intended for human and pet consumption. For accurate species identification by PCR, analytical specificity is a prerequisite (Bustin et al. 2009). The specificity of the assay system was tested using DNA extracted from 43 species of mammals, birds, fish and plants. As shown in Table 1, the horse-specific real-time PCR system positively detected the target species, while no amplification signals were obtained in the non-target animals and plants tested, meeting the desired PCR specificity requirements. The 18S rRNA PCR system showed a straightforward positive detection signal from all eukaryotic samples analyzed, evidencing the presence of amplifiable DNA in the samples (Table 1).

Besides specificity, other assay performance criteria such as linear dynamic range, PCR efficiency and sensitivity are keys in the setting up of real-time PCR methods (Bustin et al. 2009). To assess the range of real-time PCR linearity, a standard curve was constructed using ten-fold dilutions from 0.001 to 100 ng of horse DNA extracts. As shown in Fig. 1, linearity was observed for the PCR system over 6 orders of magnitude, showing a linear correlation of at least 0.99. Additionally, the slope obtained from the standard curve is close to the theoretical value of  $-3.32$ , corresponding to a 100 % PCR efficiency



**Fig. 1**  $C_p$  values obtained from serial dilution series of horse DNA in water, plotted versus the logarithm of the DNA concentrations (ng)

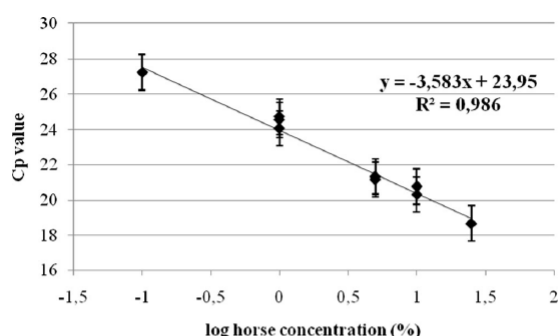
in each cycle. The results obtained suggest that the real-time PCR technique operated with a constant efficiency and has the potential to detect small amounts of horse DNA. The absolute limit of detection (LOD) of the assay was 0.5 pg of horse DNA/ $\mu$ L, corresponding to 1 pg of template DNA per reaction. This value refers to the lowest concentration of target DNA at which the method detects the presence of the analyte at least 95 % of the time (i.e.,  $\leq 5$  % false negative results) (Bustin et al. 2009) (Fig. 1).

### Analysis of Experimental Reference Binary Mixtures

The performance of the real-time PCR assay was also evaluated through a batch of heat-treated horse/beef muscle binary mixtures containing from 25 to 0.1 % of the target species, reproducing the characteristics of the processing treatments applied to commercial foods destined for human and pet consumption. At present, there is no globally accepted performance criteria defined for real-time PCR assays applied to species detection and quantification in food and feed products. The guidance document of the ENGL provides practical recommendations for validation of real-time PCR methods applied to GMO testing (European Network of GMO Laboratories 2008). This document prescribes the following minimum acceptance criteria: PCR efficiency between 90 and 110 % (corresponding to a slope of regression between  $-3.1$  and  $-3.6$ ) and  $R^2$  value  $\geq 0.98$ . As can be seen in Fig. 2, the horse-specific real-time PCR assay met these acceptance requirements and allowed successful detection of the target even at the lowest concentration level assayed (0.1 %).

The accuracy of the method in terms of trueness and repeatability (intra-assay precision) was determined by comparing the actual content of three percentage (25, 10 and 0.1 %) of the reference binary mixture, with the predicted content estimated from the average  $C_p$  value from triplicate PCR reaction of each DNA extraction, using the standard curve shown in Fig. 2 (Table 2). To estimate the trueness, the mean deviation to the true value was calculated and





**Fig. 2** Cp values obtained from reference heat-treated muscle binary mixtures, plotted versus the logarithm of the target concentrations (%)

expressed in terms of bias (%). Repeatability (relative repeatability standard deviation, RSDr) is the standard deviation of test results obtained over a short period of time and was assessed for the horse-specific assay using data collected from three repeat analyses performed on the same day. Besides, the limit of quantification (LOQ) is the lowest amount or concentration of analyte that can be reliably quantified with an acceptable level of precision and accuracy. Such LOQ precision values are given in terms of the RSDr, and the LOQ is established at the lowest level where the variability of the results meets certain preset criteria according to ENGL document (European Network of GMO Laboratories 2008) ( $RSDr \leq 25\%$ ). As can be seen in Table 2, the calculated bias of the tests ranged from 3.73 to 21.62 %, and RSDr values ranged from 0.64 to 1.11 %, demonstrating the trueness and repeatability of the assay. The LOQ was at least 0.1 % of processed (121 °C, 20 min) horse content in a beef muscle mixture.

Results obtained suggest that the real-time PCR assay reported allows specific detection of highly processed horse

material, being successfully validated at the range of 0.1 to 25 % in a binary muscle mixture model (horse/beef). However, when other complex food samples are to be considered, the assay should be carefully optimized taking into account all the potential factors found in particular food products, which is hardly feasible from a practical point of view. Considering these aspects, the application of the real-time PCR assay developed in this work to commercial meat-based products was focused on qualitative detection of the presence of horse in complex commercial foods, being quantification limited due to the heterogeneous characteristics of the analyzed samples.

Another issue covered in some quantitative PCR-based approaches is that results of test material measurements should be expressed, theoretically, in copy numbers (Ballin et al. 2012). However, in the case of species detection in foods and feeds, legislative bodies wish to define threshold limits in terms of percentages of the content (w/w). Results expressed as measured copy numbers might be reliable, but the different tissues and, consequently, different numbers of existing mitochondria and mtDNA would make PCR quantification and subsequent correlation to mass ratio content (w/w) inaccurate.

#### Real-Time PCR Analysis of Commercial Food and Feed Products

The horse real-time PCR was firstly tested for its applicability for species authentication in a total of 81 commercial meat products destined for humans. Of them, 30 were labelled to contain horse meat as the main ingredient, whereas 51 samples declared animal ingredients other than horse in their labels, including beef, pork and avian species (Table 3). Three different batches from each food sample type were

**Table 2** Trueness and repeatability for the horse-specific real-time PCR system

Actual (%) <sup>a</sup>	Horse-specific real-time PCR results (Cp) <sup>b</sup>			Mean Cp value (assays 1, 2 and 3)	Mean predicted (%) <sup>c</sup>	Bias±(%)	RSDr (%)
	Assay 1	Assay 2	Assay 3				
25	18.65	18.62	18.65	18.64	30.40	21.62	0.98
	18.63	18.60	18.67				
	18.67	18.64	18.63				
10	20.30	20.31	20.30	20.31	10.37	3.73	0.64
	20.28	20.31	20.34				
	20.32	20.32	20.31				
0.10	27.21	27.26	27.27	27.25	0.12	19.95	1.11
	27.28	27.29	27.23				
	27.23	27.26	27.22				

<sup>a</sup> Actual target material content (%) from reference binary mixtures of heat-treated horse muscle

<sup>b</sup> Average Cp value shown from triplicate PCR reactions from three DNA extractions

<sup>c</sup> Predicted contents (%) are calculated from the average Cp value from triplicate PCR reactions for each DNA extraction of replicate assays ( $n=3$ )  
RSDr relative repeatability standard deviation

**Table 3** Results of the analysis of commercial food samples using the horse-specific real-time PCR system

Code	Labelling description of commercial food products			Real-time PCR results (Cp) <sup>a</sup>	
	Product type	Declared animal species	Horse content (%)	Hr.S.S	Other non-horse species detected
F1-3	Cured meat	H	100	16.64±0.02	
F4-6	Cured meat	H	100	15.93±0.02	
F7-9	Cured meat	H	100	17.08±0.00	
F10-12	Sliced cured meat	H	100	16.24±0.04	
F13-15	Dry-cured sausage	H, P	100	16.26±0.01	P (19.02±0.00)
F16-18	Dry-cured sausage	H, B	100	16.86±0.04	B (32.01±0.02)
F19-21	Dry-cured sausage	H, B, P	65	18.20±0.00	B, P (31.30±0.02, 19.39±0.01)
F22-24	Dry-cured sausage	H, B, P	50	19.15±0.04	B, P (31.64±0.03, 15.80±0.03)
F25-27	Dry-cured sausage with paprika	H, P	100	15.86±0.07	P (19.58±0.02)
F28-30	Dry-cured sausage with paprika	H, P	100	16.92±0.05	P (15.30±0.09)
F31-33	Cured meat	P		–	P (13.58±0.00)
F34-36	Cooked sausage	C, T, P, B		–	C, T, P, B (16.12±0.03, 16.18±0.06, 16.72±0.01, 25.99±0.03)
F37-39	Meat strips	C		–	C (13.44±0.09)
F40-42	Meat product	B		–	B (13.14±0.09)
F43-45	Meat product	B		–	B (11.32±0.02)
F46-48	Meat product	B		–	B (11.74±0.00)
F49-51	Meat product	C		–	C (17.88±0.01)
F52-54	Meat product	T		–	T (12.11±0.04)
F55-57	Meat product	B		–	B (13.12±0.04)
F58-60	Burger meat	B		–	B (18.97±0.02)
F61-63	Burger meat	B		–	B (13.74±0.01)
F64-66	Burger meat	C, P, T		–	C, P, T (13.31±0.01, 14.63±0.01, 16.17±0.00)
F67-69	Burger meat	B, P		–	B, P (13.59±0.05, 15.11±0.02)
F70-72	Meatballs	B, P		–	B, P (13.98±0.08, 16.01±0.00)
F73-75	Dry-cured sausage with paprika	P		–	P (12.86±0.01)
F76-78	Dry-cured sausage	P		–	P (13.13±0.08)
F79-81	Dry-cured sausage	P		–	P (13.79±0.05)

<sup>a</sup> Average Cp value±SD shown from triplicate PCR reactions from each DNA extraction

Minus sign indicates no positive signal after 50 PCR cycles

B bovine, C chicken, H horse, P porcine, T turkey, Hr.S.S horse-specific system on the 12S rRNA gene (*Hr12SDIR/Hr12SINV* and *H12SP*)

analyzed, with no significant Cp value variability. To distinguish between a positive and a negative detection of the target in the commercial samples, a Cp value of 36 was established as threshold for the horse real-time PCR system, which was determined from the mean Cp values obtained from the lowest DNA concentration reliably detected. As shown in the Table, the horse-specific real-time PCR system reported a straightforward detection of horse DNA in the 30 samples tested claiming to contain this species, while all the food samples labelled as not containing horse ingredients gave a negative detection signal. These results suggest a total consonance with the labelling specifications provided by the suppliers. This compliance may be a consequence of the enhanced law enforcement arising from the EU control measures that were implemented at the retail level after the horse meat scandal

(EU/99/2013). At the time of our analyses, such actions could have resulted in a noticeable improvement of traceability schemes at production, wholesale and retail levels. Other recent studies have also reported the absence of horse-derived materials in a number of food samples which did not declare horse as ingredient, tested with a commercial PCR-based array kit (Cawthorn et al. 2013), although these authors found a high incidence of other animal and plant species misrepresentation on the marketplace.

As a further step, the real-time PCR assay was also tested for its capacity to detect horse DNA in a range of commercially available pet food products, including canned food, pâté, semi-moist, appetizers and dry food. As can be seen in Table 4, positive fluorescence signals were achieved in the 33 samples labelled to contain horse materials when using the

**Table 4** Results of the analysis of commercial pet food samples using the horse-specific real-time PCR system

Code	Labelling description of commercial pet food products			Real-time PCR results (Cp) <sup>a</sup>	
	Product type	Declared animal species	Horse content (%)	Hr.S.S	Other non-horse species detected
P1-3	Canned dog food	H	100	16.30±0.00	
P4-6	Canned dog food	H	NS	20.51±0.06	
P7-9	Canned cat food	H	100	16.81±0.07	
P10-12	Canned cat food	H, P	95	16.88±0.07	P (36.17±0.03)
P13-15	Pâté	H	60	16.35±0.01	
P16-18	Pâté	H	94	16.62±0.02	
P19-21	Semi-moist dog food	H	100	16.47±0.03	
P22-24	Semi-moist dog food (stomach)	H	100	16.35±0.06	
P25-27	Semi-moist dog food (heart)	H	100	18.79±0.08	
P28-30	Semi-moist dog food (trachea)	H	100	19.33±0.03	
P31-33	Semi-moist dog food (liver)	H	100	17.94±0.06	
P34-36	Canned dog food	B		–	B (18.69±0.06)
P37-39	Canned cat fillets	C, R		–	C, R (17.32±0.07, 25.22±0.09)
P40-42	Canned cat food	B		–	B (22.13±0.04)
P43-45	Cat appetizers	T, R		–	T, R (25.35±0.02, 32.19±0.09)
P46-48	Dry dog food	P, B, F, R		<b>30.02±0.08</b>	P, B, F, R (18.37±0.02, 19.90±0.03, 22.09±0.07, 28.30±0.01)
P49-51	Pâté cat food	R		–	R (23.17±0.02)
P52-54	Canned cat food	B, C, R		–	B, C, R (16.31±0.01, 16.81±0.06, 31.39±0.03)
P55-57	Canned cat food	B		–	B (19.67±0.05)
P58-60	Cat food in jelly	L, R		–	L, R (15.88±0.09, 21.92±0.09)
P61-63	Dry cat food	R		<b>32.77±0.01</b>	R (32.36±0.07)
P64-66	Dry dog food	P, R, F		–	P, R, F (20.68±0.09, 26.18±0.03, 32.69±0.02)
P67-69	Semi-moist dog food	R		–	C (17.79±0.05)
P70-72	Canned cat food	B		–	B (27.97±0.00)
P73-75	Dry dog food	P, F		–	P, F (18.00±0.04, 21.06±0.02)
P76-78	Canned dog food	F		–	F (16.11±0.09)
P79-81	Canned cat food	F		–	F (17.75±0.04)
P82-84	Dry cat food	P, F		<b>33.29±0.06</b>	P, F (20.68±0.09, 26.16±0.00)
P85-87	Dry dog food	F		–	F (30.15±0.09)
P88-90	Dry cat food	T, P		<b>34.26±0.06</b>	T, P (13.16±0.03, 27.77±0.08)

Results showing disagreeing results with labelling declaration are in bold

<sup>a</sup> Average Cp value±SD shown from triplicate PCR reactions from each DNA extraction

Minus sign indicates no positive signal after 50 PCR cycles

NS not specified, B bovine, C chicken, F fish, H horse, L lamb, P porcine, R rabbit, T turkey, Hr.S.S horse-specific system on the 12S rRNA gene (*Hr12SDIR/Hr12SINV* and *H12SP*)

horse-specific PCR system (with Cps ranging from 16 to 20), with no significant variability observed in the Cp values within each tested batch. On the other hand, results obtained on the analyses of the 57 pet food products not declaring horse in the list of ingredients evidenced that most of them (79 %) gave no positive signal in the real-time PCR assay in agreement with the label, whereas the rest of samples (21 %) yielded Cp values above 30 (Table 4). These late Cps may be indicative of an accidental presence of horse DNA traces in such samples, ascribed to inherent cross-contamination when improperly cleaned

equipment is used to process meat from more than one species, as suggested by some authors (Cawthorn et al. 2013).

Apart from the experiments conducted to detect horse in the tested commercial products, food and feed samples were also analyzed with other species-specific PCR assays developed in previous works for cattle, turkey, chicken and swine identification (Pegels et al. 2011; Pegels et al. 2012a, b), in order to provide a more complete verification of the labelling information. Each sample was analyzed with the PCR systems corresponding to the non-horse species declared in the labels (Tables 3

and 4). With respect to food products for human consumption, the results obtained were in agreement with the species composition stated on the labels (Table 3). In the case of pet food products, the results obtained also matched with the labelling, except for samples P67 to P69 (Table 4). These samples declared to contain rabbit, while the PCR assay classified this batch as negative for this species but positive for chicken, indicating a possible labelling misdescription in these pet foods. Besides, in all experiments, the 18S rRNA system yielded a straightforward and homogeneous positive signal for all the commercial samples tested, evidencing the presence of amplifiable DNA. All extracts from negative control samples were correctly assigned as negative in each run (false positive rate of 0 %), excluding false positive results due to possible contamination during extraction and/or PCR amplification (results not shown).

The development of PCR assays for animal species identification in foods and feeds has historically focused on species of high economic importance (ruminants, pig, chicken and/or turkey), contrasting with the much more limited range of assays for detection of less commonly consumed meat species like horse (Teletchea et al. 2005; Martín et al. 2009). Most of the DNA-based studies for meat species identification that include horse within the pool of animal species tested rely on the use of the PCR-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) technique (Meyer et al. 1995; Fairbrother et al. 1998; Partis et al. 2000; Santaclara et al. 2007; Doosti et al. 2011). However, PCR-RFLP may prove unsuitable for species identification in processed foods harbouring fragmented DNA and may be also limited in the analysis of admixed samples including two or more species in their composition (Girish et al. 2004; Jonker et al. 2008; Martín et al. 2009). Alternative species-specific PCR-based methods overcome such limitations, since a short target sequence can be sensitively amplified from a food matrix containing a pool of sequences. Conventional PCR assays using species-specific primers have been applied for the identification of different meat species including horse in processed foods (Matsunaga et al. 1999; Ilhak and Arslan 2007; Xu et al. 2008; Martín et al. 2009; Kesmen et al. 2010), but this technique requires post-amplification handling of PCR products thereby extending the risk of laboratory contamination, plus the dependence on agarose gel electrophoresis for analysis of the products. In contrast, real-time PCR methodology offers the ability to monitor the progress of DNA amplification in real-time and is especially suitable for processed products because very small fragments of DNA can still be amplified and identified (Hird et al. 2006). In spite of these benefits, few real-time PCR studies are reported to date for horse meat identification, most of them targeting the mitochondrial cytochrome b gene (Chisholm et al. 2005; Tanabe et al. 2007; Jonker et al. 2008). As an alternative to mitochondrial-based assays, the work by Köppel et al. (2011) has evaluated a novel multiplex real-time PCR approach using a single-copy nuclear

DNA for detection and quantification of beef, pork, horse and sheep. However, these authors reported some cross-reactivity of the horse system with species like donkey.

With respect to the number of published works focused on species authentication, products destined for the feeding of pets are even scarcer (Dalmasso et al. 2004; Myers et al. 2004; Wang et al. 2004; Cawthraw et al. 2009; Rojas et al. 2011), and these do not report the detection of horse. Since 2009, Regulation EC/767/2009 on the marketing and labelling of feed materials and compound feeds has extended the feed safety principles to feed for non-food-producing animals (e.g. pets), to ensure comprehensive and consistent application of feed hygiene and traceability measures. Molecular methods targeting the different meat species that can be present on a product, including less commonly consumed meat species like horse, are therefore necessary for authentication of transformed foods such as cat and dog meals, where frauds have to be avoided or recognized (Teletchea et al. 2005). To our knowledge, the 12S rRNA-based real-time PCR described herein is the first of this kind applied as a field assay to screen the labelling compliance with respect to horse ingredients in different retail meat products for human and pet consumption.

## Conclusion

The TaqMan real-time PCR system developed in this work has shown to be a specific and sensitive tool for detection of low levels of horse DNA in different meat-based products destined for human and pet consumption. Within the frame of genetic traceability, the PCR-based protocol herein developed can be applied by industry and regulators to achieve species authentication in processed foods and protect consumers against fraud.

**Acknowledgements** This work was supported by the Programa de Vigilancia Sanitaria 2009/AGR/1489 of the Comunidad de Madrid (Spain). Nicolette Pegels is recipient of a fellowship from the Ministerio de Educación (Spain).

**Conflict of Interest** Nicolette Pegels has no conflict. Teresa García has no conflict. Rosario Martín has no conflict. Isabel González has no conflict. This article does not contain any studies with human or animal subjects.

## References

- Ballin NZ, Vogensen FK, Karlsson AH (2012) PCR amplification of repetitive sequences as a possible approach in relative species quantification. *Meat Sci* 90:438–443
- Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellems J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL, Vandesompele J, Wittwer CT (2009) The MIQE guidelines: minimum information

- for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem* 55:611–622. doi:10.1373/clinchem.2008.112797
- Cawthorn D-M, Steinman HA, Hoffman LC (2013) A high incidence of species substitution and mislabelling detected in meat products sold in South Africa. *Food Control* 32:440–449. doi:10.1016/j.foodcont.2013.01.008
- Cawthraw S, Saunders GC, Martin TC, Sawyer J, Windl O, Reaney SD (2009) Real-time PCR detection and identification of prohibited mammalian and avian material in animal feeds. *J Food Prot* 72:1055–1062
- Chisholm J, Conyers C, Booth C, Lawley W, Hird H (2005) The detection of horse and donkey using real-time PCR. *Meat Sci* 70:727–732. doi:10.1016/j.meatsci.2005.03.009
- Dalmasso A, Fontanella E, Piatti P, Civera T, Rosati S, Bottero MT (2004) A multiplex PCR assay for the identification of animal species in feedstuffs. *Mol Cell Probes* 18:81–87. doi:10.1016/j.mcp.2003.09.006
- Doosti A, Ghasemi Dehkordi P, Rahimi E (2011) Molecular assay to fraud identification of meat products. *J Food Sci Technol* 51:148–152. doi:10.1007/s13197-011-0456-3
- EC/178/2002 (2002) Commission Regulation EC/178/2002 of 28 January 2002 laying down the general principles and requirements of food law, establishing the European Food Safety Authority and laying down procedures in matters of food safety. *Off J Euro Commun L* 31:1–24. <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2002:031:0001:0024:EN:PDF>. Accessed 3 February 2014
- EC/767/2009 (2009) Commission Regulation EC/767/2009 of the European Parliament and of the Council of 13 July 2009 on the placing on the market and use of feed, amending European Parliament and Council Regulation (EC) No 1831/2003 and repealing Council Directive 79/373/EEC, Commission Directive 80/511/EEC, Council Directives 82/471/EEC, 83/228/EEC, 93/74/EEC, 93/113/EC and 96/25/EC and Commission Decision 2004/217/EC. *Off J Euro Commun L* 229:1–28. <http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2009:229:0001:0028:EN:PDF>. Accessed 3 February 2014
- EU/99/2013 (2013) Commission Recommendation EU/99/2013 of 19 February 2013 on a coordinated control plan with a view to establish the prevalence of fraudulent practices in the marketing of certain foods. *Off J Euro Commun L* 48:28–32. <http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2013:048:0028:0032:EN:PDF>. Accessed 3 February 2014
- European Commission (2013) Commission publishes European test results on horse DNA and Phenylbutazone: no food safety issues but tougher penalties to apply in the future to fraudulent labelling (press release). [http://europa.eu/rapid/press-release\\_IP-13-331\\_en.htm](http://europa.eu/rapid/press-release_IP-13-331_en.htm). Accessed 3 February 2014
- European Network of GMO Laboratories (2008) Definition of minimum performance requirements for analytical methods of GMO testing. [http://mo-crl.jrc.ec.europa.eu/doc/Min\\_Perf\\_Requirements\\_Analytical\\_methodspdf](http://mo-crl.jrc.ec.europa.eu/doc/Min_Perf_Requirements_Analytical_methodspdf). Accessed 3 February 2014
- Fairbrother KS, Hopwood AJ, Lockley AK, Bardsley RG (1998) Meat speciation by restriction fragment length polymorphism: analysis using an  $\alpha$ -actin cDNA probe. *Meat Sci* 50:105–114
- Girish PS, Anjaneyulu ASR, Viswas KN, Anand M, Rajkumar N, Shivakumar BM, Bhaskar S (2004) Sequence analysis of mitochondrial 12S rRNA gene can identify meat species. *Meat Sci* 66:551–556. doi:10.1016/S0309-1740(03)00158-X
- Hird H, Chisholm J, Sánchez A, Hernández M, Goodier R, Schneede K, Boltz C, Popping B (2006) Effect of heat and pressure processing on DNA fragmentation and implications for the detection of meat using a real-time polymerase chain reaction. *Food Addit Contam A* 23:645–650. doi:10.1080/02652030600603041
- Huber I, Block A, Sebah D, Debode F, Morisset D, Grohmann L, Berben G, Stebih D, Milavec M, Zel J, Busch U (2013) Development and validation of duplex, triplex, and pentaplex real-time PCR screening assays for the detection of genetically modified organisms in food and feed. *J Agric Food Chem* 61:10293–10301. doi:10.1021/jf402448y
- Ilhak OI, Arslan A (2007) Identification of meat species by polymerase chain reaction (PCR) technique. *Turk J Vet Anim Sci* 31:159–163
- Jonker KM, Tilburg JJHC, Hägele GH, De Boer E (2008) Species identification in meat products using real-time PCR. *Food Addit Contam A* 25:527–533. doi:10.1080/02652030701584041
- Kesmen Z, Yetim H, Sahin F (2010) Identification of different meat species used in sucuk production by PCR assay. *GIDA* 35:81–87
- Kesmen Z, Yetiman AE, Sahin F, Yetim H (2012) Detection of chicken and turkey meat in meat mixtures by using real-time PCR assays. *J Food Sci* 77:167–173. doi:10.1111/j.1750-3841.2011.02536.x
- Köppel R, Ruf J, Rentsch J (2011) Multiplex real-time PCR for the detection and quantification of DNA from beef, pork, horse and sheep. *Eur Food Res Technol* 232:151–155. doi:10.1007/s00217-010-1371-y
- Lenstra JA (2003) DNA methods for identifying plant and animal species in food. In: Lees M (ed) *Food authenticity and traceability*. CRC Press, Florida, pp 34–36
- Martin I, García T, Fajardo V, Rojas M, Hernández PE, González I, Martín R (2009) Detection of horse DNA in food and feedstuffs using a polymerase chain reaction assay. *J Sci Food Agric* 89:1202–1206. doi:10.1002/jsfa.3576
- Matsunaga T, Chikuni K, Tanabe R, Muroya S, Nakai H, Shibata K, Yamada J, Shinmura Y (1999) A quick and simple method for the identification of meat species and meat products by PCR assay. *Meat Sci* 51:143–148
- Meyer R, Candrian U (1996) PCR-based DNA analysis for the identification and characterization of food components. *Lebensm Wiss Technol* 29:1–9
- Meyer R, Höfelein C, Luthy J, Candrian U (1995) Polymerase chain reaction-restriction length polymorphism analysis: a simple method for species identification in food. *J AOAC Int* 78:1542–1551
- Montowska M, Pospiech E (2011) Authenticity determination of meat and meat products on the protein and DNA basis. *Food Rev Int* 27:84–100. doi:10.1080/87559129.2010.518297
- Myers MJ, Farrell DE, Heller DN, Yancy HF (2004) Development of a polymerase chain reaction based method to identify species-specific components in dog food. *Am J Vet Res* 65:99–103
- Nader W, Brendel T, Schubert R (2013) DNA-analysis: enhancing the control of food authenticity through emerging technologies. *Agro Food Ind Hi Tech* 24:42–46
- O'Mahony PJ (2013) Finding horse meat in beef products—a global problem. *Q J Med* 106:595–597. doi:10.1093/qjmed/hct087
- Partis L, Croan D, Guo Z, Clark R, Coldham T, Murby J (2000) Evaluation of a DNA fingerprinting method for determining the species origin of meats. *Meat Sci* 54:369–376
- Pegels N, González I, Fernández S, García T, Martín R (2012a) Sensitive detection of porcine DNA in processed animal proteins using TaqMan real-time PCR assay. *Food Addit Contam A* 29:1402–1412. doi:10.1080/19440049.2012.696284
- Pegels N, González I, López-Calleja I, Fernández S, García T, Martín R (2012b) Evaluation of a TaqMan real-time PCR assay for detection of chicken, turkey, duck, and goose material in highly processed industrial feed samples. *Poult Sci* 91:1709–1719. doi:10.3382/ps.2011-01954
- Pegels N, González I, López-Calleja I, García T, Martín R (2013a) Detection of fish-derived ingredients in animal feeds by a TaqMan real-time PCR assay. *Food Anal Method* 6:1040–1048. doi:10.1007/s12161-012-9555-7
- Pegels N, González I, Martín I, Rojas M, García T, Martín R (2011) Applicability assessment of a real-time PCR assay for the specific detection of bovine, ovine and caprine material in feedstuffs. *Food Control* 22:1189–1196. doi:10.1016/j.foodcont.2011.01.015

- Pegels N, López-Calleja I, García T, Martín R, González I (2013b) Detection of rabbit and hare processed material in compound feeds by TaqMan real-time PCR. *Food Addit Contam A* 30:771–779. doi:10.1080/19440049.2013.794978
- Pereira F, Carneiro J, Matthiesen R, van Asch B, Pinto N, Gusmao L, Amorim A (2010) Identification of species by multiplex analysis of variable-length sequences. *Nucleic Acids Res* 38:e203. doi:10.1093/nar/gkq865
- Prado M, Boix A, von Holst C (2013) Development of a real-time PCR method for the simultaneous detection of mackerel and horse mackerel. *Food Control* 34:19–23. doi:10.1016/j.foodcont.2013.04.007
- Rojas M, González I, de la Cruz S, Hernández PE, García T, Martín R (2011) Application of species-specific polymerase chain reaction assays to verify the labeling of quail (*Coturnix coturnix*), pheasant (*Phasianus colchicus*) and ostrich (*Struthio camelus*) in pet foods. *Anim Feed Sci Technol* 169:128–133. doi:10.1016/j.anifeedsci.2011.05.006
- Santaclara FJ, Espiñeira M, Cabado AG, Vieites JM (2007) Detection of land remains in fish meals by the polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism technique. *J Agric Food Chem* 55:305–310. doi:10.1021/jf061840l
- Soares S, Amaral JS, Oliveira MBPP, Mafra I (2013) A SYBR Green real-time PCR assay to detect and quantify pork meat in processed poultry meat products. *Meat Sci* 94:115–120. doi:10.1016/j.meatsci.2012.12.012
- Tanabe S, Hase M, Yano T, Sato M, Fujimura T, Akiyama H (2007) A real-time quantitative PCR detection method for pork, chicken, beef, mutton, and horseflesh in foods. *Biosci Biotechnol Biochem* 71:3131–3135. doi:10.1271/bbb.70683
- Teletchea F, Maudet C, Hänni C (2005) Food and forensic molecular identification: update and challenges. *Trends Biotechnol* 23:359–366. doi:10.1016/j.tibtech.2005.05.006
- Wang HC, Lee SH, Chang TJ, Wong ML (2004) Examination of meat components in commercial dog and cat feed by using polymerase chain reaction–restriction fragment length polymorphisms (PCR–RFLPs) technique. *J Vet Med Sci* 66:855–859
- Woolfe M, Primrose S (2004) Food forensics: using DNA technology to combat misdescription and fraud. *Trends Biotechnol* 22:222–226. doi:10.1016/j.tibtech.2004.03.010
- Xu WT, Bai WB, Luo YB, Yuan Y, Zhang W, Guo X, Huang K (2008) A novel common single primer multiplex polymerase chain reaction (CSP-M-PCR) method for the identification of animal species in minced meat. *J Sci Food Agric* 88:2631–2637. doi:10.1002/jsfa.3382
- Yusop MHM, Mustafa S, Che-Man YB, Omar AR, Mokhtar NFK (2012) Detection of raw pork targeting porcine-specific mitochondrial cytochrome b gene by molecular beacon probe real-time polymerase chain reaction. *Food Anal Method* 5:422–429. doi:10.1007/s12161-011-9260-y





### III.2. IDENTIFICATION OF EPIGENETIC MARKERS BASED ON DNA METHYLATION FOR DETERMINING THE TISSUE ORIGIN OF FEED INGREDIENTS

*Predoctoral stay at the European Union Reference Laboratory for Animal Proteins in feedingstuffs, EURL-AP, Belgium*





### III.2.1. Introduction

The permanent ban within the European Union (EU) on the use of processed animal proteins (PAPs), including meat and bone meals (MBMs), as ingredients in feed for all farm animals (Regulation EC 999/2001) seems to be the most effective preventive measure to avoid the dissemination of bovine spongiform encephalopathy (BSE) and other transmissible spongiform encephalopathies (TSEs), and to minimize any potential risk of transmission to humans. The prohibition of the use of animal by-products depends on their type, their species origin and the feed's destination (Lecrenier et al., 2014). At present, light microscopy and PCR are the methods officially accepted for detection of animal ingredients in feeds by the European Union (Regulation EU 51/2013). In particular, PCR has been extensively applied for species authentication in feedstuffs and is currently the technique of choice to determine the origin of animal by-products present in a feed at the species level (Fumière et al., 2010). More recent reports have focused on the use of real-time PCR for this purpose (Ekins et al., 2012; Fumière et al., 2012a, b). However, one of the reported drawbacks of PCR-based methods is linked to the fact that authorized feed ingredients (*e.g.* milk products or animal fats) may also be sources of animal DNA. Such DNA presence in feeds may hence lead to false PCR positive results from a legal point of view, although it would not reflect non-compliance with the feed ban from a scientific perspective (Bellorini et al., 2005; Prado et al., 2007; Fumière et al., 2010).

Recently, epigenetic markers have been explored as an alternative tool for tissue identification in different fields, including food authentication (Gout et al., 2004) and forensics (Frumkin et al., 2011; Madi et al., 2012; Wasserstrom et al., 2013). Epigenetics refers to the study of heritable alterations in gene function or cellular phenotype caused by mechanisms not directly encoded by the DNA sequence itself, but by chemical modifications of the chromatin in form of DNA methylation and histone modifications, both of which play a significant role in regulating gene expression (Eckhardt et al., 2006). While the primary sequence of DNA is largely preserved in all cells, the DNA methylation profile is unique to individual cells or tissue types (Hirabayashi et al., 2013; Roadmap Epigenomics Consortium, 2015). A DNA methylation-based analysis may therefore potentially overcome some of the limitations of existing PCR methods, in terms of providing a direct link between the recovered DNA profile and its tissue source (Vidaki et al., 2013).

In mammals, DNA methylation involves the covalent addition of a methyl group ( $-\text{CH}_3$ ) at the 5' position of the cytosine (C) ring followed by guanine (G) (*i.e.* the CpG dinucleotide, where the "p" stands for the phosphoryl bond between the two bases). This modified residue is distributed throughout the majority of the genome, including gene bodies, endogenous repeats and transposable elements, and is generally believed to repress transcription. The genome is punctuated, however, by non-methylated DNA sequences called CpG islands that lie in the promoter region of genes (Illingworth and Bird, 2009). Regardless of the mechanism by which methylation affects gene expression,

which remains poorly understood, differential methylation patterns between different tissues have been demonstrated (Frumkin et al., 2011). Eckhardt et al. (2006) described methylation patterns at tissue-specific differentially methylated regions (DMRs) to be stable and specific, making them excellent markers for tissue identification (Madi et al., 2012).

Considering these aspects, the aim of the research performed during the predoctoral stay at the European Union Reference Laboratory for Animal Proteins in feedingstuffs (EURL-AP, *Centre Wallon de Recherches Agronomiques*, CRA-W, Gembloux, Belgium) was to complement the work developed in this PhD Thesis, in terms of evaluating if epigenetic markers based on DNA methylation could be used as sensitive tool to determine the tissue origin of the animal ingredients present in feeds. As a starting point of this work, a novel tissue-specific epigenetic marker, the bovine glial fibrillary acidic protein (GFAP) gene, was identified and used to differentiate between nervous (brain and spinal cord) and non nervous tissue (muscle, liver, heart and milk) in the bovine species. The assay is based on bisulfite modified template DNA amplified via PCR followed by pyrosequencing, a next generation sequencing technique that permits accurate estimation of the relative quantity of the methylation level for each CpG site targeted.

### **III.2.2. Materials and Methods**

#### ***III.2.2.1. Sample selection and DNA extraction***

Different bovine tissues: brain, spinal cord, muscle, liver, heart and milk were obtained from retail markets (Gembloux, Belgium). Authenticity of animal tissues was confirmed upon morphological characteristics of an entire animal. Fresh tissue portions from the selected specimens were cut into small pieces and stored frozen at -20 °C until use.

In order to check the ability of the technique in processed products, samples from bovine species (muscle, spinal cord and brain tissue) were also analyzed after being subjected to experimental sterilization at 121 °C for 20 min. Temperature was checked by introducing a temperature data logger in the autoclave, together with the tissue.

Genomic DNA was obtained from 25 mg of each tissue sample using the *DNeasy<sup>®</sup> Blood & Tissue* Kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany), according to manufacturer's instructions. The DNA was eluted in 200 µL of sterile deionized water and its concentration was measured with a *NanoDrop<sup>®</sup> ND-1000* spectrophotometer (NanoDrop Technologies Inc., Montchanin, DE, USA). Unless otherwise stated, three DNA replicates were extracted from each tissue sample. A negative control sample was included in every DNA extraction.

#### ***III.2.2.2. Bisulfite modification from extracted DNA***

Bisulfite treatment of the extracted DNA was carried out using the *Epitect<sup>®</sup> Fast DNA Bisulfite* Kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany) according to manufacturer's

instructions. This procedure chemically converts unmethylated cytosine residues to uracil and leaves methylated cytosine residues unconverted. Subsequent PCR amplification using specific methylation primers then amplifies the uracil residues as thymine, giving a permanent record of the methylation status of the gene in the loci of interest.

#### **III.2.2.3. Loci selection and assay design**

The oligonucleotides used in this work were designed upon the glial fibrillary acidic protein (GFAP) gene promoter region sequences from bovine (Gout et al., 2004) and rat (Condorelli et al., 1994) available in the NCBI (National Center for Biotechnology Information) database. Alignment and computer analysis of GFAP gene promoter region sequences (Figure 1) allowed us the design of a set of PCR primers for the amplification of a DNA fragment of 139 base pair (bp) in the bovine genome, containing a total of 4 CpG dinucleotides (2 of them shared with the rat species). The reverse primer was biotin labeled allowing for the production of biotinylated PCR product necessary for the pyrosequencing reactions. Apart from the primer pair, one sequencing primer was designed to anneal within the fragment generated by amplification and was used to analyze the sequence targeting the 4 CpG sites from the biotinylated PCR products. The sequences and description of every primer used in this study are listed in Table 1.

#### **III.2.2.4. PCR amplification and pyrosequencing**

The PCR reactions were carried out using the *GeneAMP-PCR System 9600* thermal cycler (Perkin Elmer, Foster City, California, USA) with the following program: 4 min at 95 °C, an amplification program of 50 cycles at 95 °C for 15 s, 55 °C for 15 s, and 72 °C for 5 min. Unless otherwise indicated, all real-time PCR reactions were carried out in triplicate for each DNA extract. PCR amplification reactions were performed in a total volume of 50 µl. Each reaction mixture contained 10 ng template DNA, 5 µl MgCl<sub>2</sub> (25mM) (Invitrogen, Gent, Belgium), 5 µl of each dNTPs (2 mM) (Sigma, Bornem, Belgium), 2 µl of each primer (*GFAP-UP-F3/GFAP-UP-RBIOT3*) (5 µM) (Eurogentec S.A., Liège, Belgium), and 0.25 µl of *Taq* DNA polymerase (5 U/µl) (Invitrogen, Gent, Belgium) in a reaction buffer containing 200 mM Tris-HCl, pH 8.4, and 500 mM KCl. PCR products (15 µl) were mixed with 2 µl of Gel Loading Solution, and analyzed by electrophoresis in a 2.5 % agarose gel containing 1 µg/mL ethidium bromide in Tris-acetate buffer.

PCR products were prepared for sequencing using the PyroMark Q24 vacuum workstation (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany) according to manufacturer's instructions. All pyrosequencing reactions were performed with the *PyroMark*<sup>®</sup> Q24 Pyrosequencer (QIAGEN) combined with the *PyroMark*<sup>®</sup> Q24 Assay software (QIAGEN). Following the sequencing reaction, the data collected was analyzed using the *PyroMark*<sup>®</sup> Q24 Assay software for CpG methylation quantification and the corresponding percent methylation values for each site was displayed as a Pyrogram<sup>®</sup>.

### III.2.3. Results and Discussion

#### III.2.3.1. Methylation profile of the bovine GFAP gene promoter region

Several works have identified differential DNA methylation patterns between different tissues, providing epigenetic markers that will be helpful for improving the use of DNA to discriminate tissue type (Frumkin et al., 2011). Teter et al. (1994a, b) and Condorelli et al. (1994, 1997) identified a neural-specific hypomethylated domain in the 5' flanking region of the rat glial fibrillary acidic protein (GFAP) gene, showing a tissue-specific locus. The GFAP is an intermediate filament protein, specific of the cytoskeleton of astrocytes in the central nervous system (Condorelli et al., 1994). These studies characterized the rat GFAP promoter region, describing that brain tissue has about 50 % less methylated cytosine than other non neuronal tissues in the seven 5'-far upstream CpG sites examined within the target region (Figure 1). Based on these premises, in this study, the bovine GFAP promoter sequences described by Gout et al. (2004) were selected to discriminate between nervous (brain and spinal cord) and non nervous (muscle, liver, heart and milk) tissue in the bovine species.

In order to analyze the methylation status at this particular region of the bovine genome, PCR reactions were carried out in triplicate for each bisulfite modified DNA extract from different bovine tissues: spinal cord, brain, muscle, liver, heart and milk. Results obtained showed the the *GFAP-UP-F3/GFAP-UP-RBIOT3* primer set successfully amplified the expected 139 bp fragment on the GFAP gene promoter region from all tissue-type samples analyzed (Figure 2). Pyrosequencing reactions were then performed on bisulfite modified, amplified, and biotinylated template DNA using the sequencing primer *GFAP-UP-S4*. Pyrosequencing technology is based on the sequencing by synthesis principle, and generates highly reproducible quantification of methylation frequencies at individual consecutive CpG sites (Madi et al., 2012), allowing us to explore the possible application of epigenetic markers to the identification of animal tissues present in animal feeds. Once the pyrosequencing was completed, the data collected was analyzed and the results were displayed as a Pyrogram<sup>®</sup> with percent methylation values at each CpG site. Figure 3 illustrates an example of methylation levels at the four CpG sites targeted in the promoter region of the GFAP gene, that generated three methylation profiles corresponding to the bovine tissues analyzed from muscle (Figure 3A), spinal cord (Figure 3B), and brain (Figure 3C). Results achieved in the rest of the non neuronal tissues tested (liver, heart and milk) were similar to those obtained for the muscle samples (results not shown). The methylation profile obtained in the Pyrogram<sup>®</sup> showed that neuronal tissue (brain and spinal cord) has about 50 % less methylated cytosine at this particular marker in relation to muscle and the rest of non neuronal tissue analyzed. As can be seen in Table 2, mean methylation values obtained at CpG sites 2 and 3 in muscle were 94.3 and 99 %, respectively, whereas, averaged methylation values obtained at these same sites ranged from 43.7 to 52 % in the neuronal tissues. The first and the fourth CpG sites cannot be considered hypermethylated in muscle (56.3 and 63 %, respectively), but these percentages remain

almost twice as higher as what is measured in the neuronal tissue at these same sites. These observations are in line with the works published by Teter et al. (1994a, b) and Condorelli et al. (1994, 1997) which demonstrated that the brain tissue has about 50 % less methylated cytosine than non expressing tissues in the 5'-far upstream rat GFAP promoter region, and add further evidence to the concept that many epigenetic states may be evolutionarily conserved between mammals (Eckhardt et al., 2006). The result obtained in this work evidenced the presence of a neural-specific hypomethylated region in the bovine GFAP promoter which could differentiate nervous tissue (brain and spinal cord) from the other four tissues examined (muscle, liver, heart and milk), and therefore suggest its potential applicability for the identification of the tissue source of animal ingredients in processed samples such as feeds.

#### ***III.2.3.2. Analysis of experimental heat treated tissues***

To assess the suitability of the methodology developed to discriminate animal ingredients in feeds, initial analyses were done with heat treated (121 °C for 20 min) samples from various bovine tissue-types: muscle, spinal cord and brain. As shown in Figure 4, PCR amplification was achieved in the heat treated tissue samples analyzed, although a very faint PCR product was obtained in the case of sterilized spinal cord. Therefore, pyrosequencing runs were performed only for heat treated bovine muscle and brain samples. Results obtained in the Pyrograms<sup>®</sup> for heat treated muscle tissue showed that mean methylation values were reduced over the half when compared to raw muscle samples, suggesting that high processing temperatures may decrease the methylation percentages at these specific sites. However, brain tissue methylation patterns displayed a high similarity between the raw and the heat treated samples (results not shown), suggesting that brain tissue is much less affected by processing temperatures than muscle and leading to a controversial result in this part of the study. These observations are in agreement with previously reported works that argue that, although DNA is highly stable molecule, its survival to drastic processes is variable and depends on the nature of the tissue tested (Fumière et al., 2009; Pegels et al., 2012a, b). In mammals, methyl groups are attached to cytosine rings by a covalent bond, a type of bond which, given its stability, could provide DNA methylation analysis with potential to identify the tissue origin in processed matrices. However, the results obtained so far were not conclusively proven, and further research work with a wider representation of tissue-type samples subjected to different processing temperatures would still be required to validate the developed methodology.

#### **III.2.4. Conclusions**

In this work, a neural-specific epigenetic marker in the bovine GFAP promoter region that displayed differences in the methylation patterns of certain CpG dinucleotides between nervous tissue (brain and spinal cord) and the rest of the tissues analyzed (muscle, liver, heart and milk) was identified. Pyrosequencing analysis of bisulfite-converted DNA resulted in quantitative data on relative methylation levels of the analyzed samples, yielding easy discrimination of the tissue type. The results

obtained in this study evidenced a promising application of the technique for the specific differentiation of DNA derived from different bovine tissues. However, additional work should be performed in order to demonstrate its applicability to determine the tissue origin in feeds.

### Acknowledgements

This research work was developed during the predoctoral stay at the European Union Reference Laboratory for Animal Proteins in feedingstuffs (EURL-AP, *Centre Wallon de Recherches Agronomiques*, CRA-W, Gembloux, Belgium) under the direction of Dr. O. Fumière and Dr. G. Berben. The author would like to acknowledge Dr Fumière and Dr Berben for their enthusiastic guidance and advice, and Julien Maljean who provided assistance and help throughout this research work.

### References

- BELLORINI, S., STRATHMANN, S., BAETEN, V., FUMIÈRE, O., BERBEN, G., TIRENDI, S. and VON HOLST, C. (2005). Discriminating animal fats and their origins: assessing the potentials of Fourier transform infrared spectroscopy, gas chromatography, immunoassay and polymerase chain reaction technique. **Analytical and Bioanalytical Chemistry** 382, 1073-1083.
- CONDORELLI, D.F., NICOLETTI, V.G., BARRESI, V., CARUSO, A., CONTICELLO, S., DE VELLIS, J. and GIUFFRIDA STELLA, A.M. (1994). Tissue-specific DNA methylation patterns of the rat glial fibrillary acidic protein gene. **Journal of Neuroscience Research** 39, 694-707.
- CONDORELLI, D.F., DELL'ALBNI, P., CONTICELLO, S.G., BARRESI, V., NICOLETTI, V.G., CARUSO, A., KAHN, M., VACANTI, M., ALBANESE, V., DE VELLIS, J. and GIUFFRIDA STELLA, A.M. (1997). A neural-specific hypomethylated domain in the 5' flanking region of the glial fibrillary acidic protein gene. **Developmental Neuroscience** 19, 446-456.
- ECKHARDT, F., LEWIN, J., CORTESE, R., RAKYAN, V.K., ATTWOOD, J., BURGER, M., BURTON, J., COX, T.V., DAVIES, R., DOWN, T.A., HAEFLIGER, C., HORTON, R., HOWE, K., JACKSON, D.K., KUNDE, J., KOENIG, C., LIDDLE, J., NIBLETT, D., OTTO, T., PETTETT, R., SEEMANN, S., THOMPSON, C., WEST, T., ROGERS, J., OLEK, A., BERLIN, K. and BECK, S. (2006). DNA methylation profiling of human chromosomes 6, 20 and 22. **Nature Genetics** 38, 1378-1385.
- EKINS, J., PETERS, S.M., JONES, Y.L., SWAIM, H., HA, T., LA NEVE, F., CIVERA, T., BLACKSTONE, G., VICKERY, M.C.L., MARION, B., MYERS, M.J. and YANCY, H.F. (2012). Development of a multiplex real-time PCR assay for the detection of ruminant DNA. **Journal of Food Protection** 75, 1107-1112.
- FRUMKIN, D., WASSERSTROM, A., BUDOWLE, B. and DAVIDSON, A. (2011). DNA methylation-based forensic tissue identification. **Forensic Science International: Genetics** 5, 517-524.
- FUMIÈRE, O., MARIEN, A., FERNÁNDEZ PIERNA, J.A., BAETEN, V. and BERBEN, G. (2010). Development of a real-time PCR protocol for the species origin confirmation of isolated animal particles detected by NIRM. **Food Additives and Contaminants** 27, 1118-1127.



- FUMIÈRE, O., VEYS, P., BOIX, A., VON HOLST, C., BAETEN, V. and BERBEN, G. (2009). Methods of detection, species identification and quantification of processed animal proteins in feedingstuffs. **Biotechnology, Agronomy, Society and Environment** 13, 59-70.
- FUMIÈRE, O., MARIEN, A. and BERBEN, G. (2012a). Validation study of a real-time PCR method developed by TNO Triskelion bv for the detection of ruminant DNA in feedingstuffs. Preliminary Report, March 2012, CRA-W, EURL-AP, Gembloux, Belgium.
- FUMIÈRE, O., MARIEN, A. and BERBEN, G. (2012b). EURL-AP PCR implementation test 2012. Final version. Report, May 2012, CRA-W, EURL-AP, Gembloux, Belgium.
- GOUT, S., VALDIVIA, H., MCDOWELL, D. and HARRIS, N. (2004). Detection of neuronal tissue in meat using tissue specific DNA modifications. **Biotechnology, Agronomy, Society and Environment** 8, 229-234.
- HIRABAYASHI, K., SHIOTA, K. and YAGI, S. (2013). DNA methylation profile dynamics of tissue-dependent and differentially methylated regions during mouse brain development. **BMC Genomics** 14, 82.
- ILLINGWORTH, R.S. and BIRD, A.P. (2009). CpG islands - 'a rough guide'. **FEBS Letters** 583, 1713-1720.
- LECRENIER, M.C., LEDOUX, Q., BERBEN, G., FUMIÈRE, O., SAEGERMAN, C., BAETEN, V. and VEYS, P. (2014). Determination of the ruminant origin of bone particles using fluorescence in situ hybridization (FISH). **Scientific Reports** 4, 5730.
- MADI, T., BALAMURUGAN, K., BOMBARDI, R., DUNCAN, G. and MCCORD, B. (2012). The determination of tissue-specific DNA methylation patterns in forensic biofluids using bisulfite modification and pyrosequencing. **Electrophoresis** 33, 1736-1745.
- PEGELS, N., GONZÁLEZ, I., FERNÁNDEZ, S., GARCÍA, T. and MARTÍN, R. (2012a) Sensitive detection of porcine DNA in processed animal proteins using TaqMan real-time PCR assay. **Food Additives and Contaminants** 29, 1402-1412.
- PEGELS, N., GONZÁLEZ, I., LÓPEZ-CALLEJA, I., FERNÁNDEZ, S., GARCÍA, T. and MARTÍN, R. (2012b). Evaluation of a TaqMan real-time PCR assay for detection of chicken, turkey, duck, and goose material in highly processed industrial feed samples. **Poultry Science** 91, 1709-1719.
- PRADO, M., BERBEN, G., FUMIÈRE, O., VAN DUIJN, G., MENSINGA-KRUIZE, J., REANEY, S., BOIX, A. and VON HOLST, C. (2007). Detection of ruminant meat and bone meals in animal feed by real-time polymerase chain reaction: result of an interlaboratory study. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 55, 7495-7501.
- REGULATION 999/2001/EC of the European Parliament and of the Council of 22 May 2001 laying down rules for the prevention, control and eradication of certain transmissible spongiform encephalopathies. **Official Journal of European Communities** L147, 1-40.
- REGULATION 51/2013/EU of the Commission of 16 January 2013 amending Regulation (EC) No 152/2009 as regards the methods of analysis for the determination of constituents of animal origin for the official control of feed. **Official Journal of European Union** L20, 33-43.

- ROADMAP EPIGENOMICS CONSORTIUM (2015). Integrative analysis of 111 reference human epigenomes. **Nature** 518, 317-330.
- TETER, B., FINCH, C.E. and CONDORELLI, D.F. (1994a). DNA methylation in the glial fibrillary acidic protein gene: map of CpG methylation sites and summary of analysis by restriction enzymes and by LMPCR. **Journal of Neuroscience Research** 39, 708-709.
- TETER, B., OSTERBURG, H.H., ANDERSON, C.P. and FINCH, C.E. (1994b). Methylation of the rat glial fibrillary acidic protein gene shows tissue-specific domains. **Journal of Neuroscience Research** 39, 680-693.
- VIDAKI, A., DANIEL, B. and COURT, D.S. (2013). Forensic DNA methylation profiling- potential opportunities and challenges. **Forensic Science International: Genetics** 7, 499-507.
- WASSERSTROM, A., FRUMKIN, D., DAVIDSON, A., SHPITZEN, M., HERMAN, Y. and GAFNY, R. (2013). Demonstration of DSI-semen- a novel DNA methylation-based forensic semen identification assay. **Forensic Science International: Genetics** 7, 136-142.

```

          610      620      630      640      650      660
    ----:----|----:----|----:----|----:----|----:----|----:----|
    rat      AATGGTCAGGGGCGGGCACACAGCCTGATTCCCGCTGCACTCCAGGCCCCCTTCAATGCT
    bov      .G.....-T.....G.....C.C.....A....C....CT....CAG.....
    Consensus AgTGGTCAGGGgtGGGCACAgAGCCTGcTcCCCGCaGCACcCCAGctCCCCTcagATGCT

          670      680      690      700      710      720
    ----:----|----:----|----:----|----:----|----:----|----:----|
    rat      TTCCGAGAAGTCCATTGAGCTGGGAGCTTGTACTGCACCAAGGGCTGACATCCTGGCAGC
    bov      ..........CT.T.....AA..G.....GG...AGT.C.C-.CA..GGG.....A.
    Consensus TTCCCGAGAAAGctCtTTGAGCaaGGgGCTTGggCTGagtCccGcgCcaACgggCTGGCAaC

          730      740      750      760      770      780
    ----:----|----:----|----:----|----:----|----:----|----:----|
    rat      CAGGGATGAAAGCAGCCCAT-----GGGGCTACCCTTGCCGTATG----CCTCACT
    bov      TT.....A....A..GCCCCCTGCA.....G....C..T.AGC..ATGC.....C
    Consensus ttGGGATGAAAaCAGCaCAgccccctgcaGGGGCTgCCCTcGctGagcGatgcCCTCACc

          790      800      810      820      830      840
    ----:----|----:----|----:----|----:----|----:----|----:----|
    rat      GGCGGCAGAGAACAAGGCTCTATTTCAGCAAATACCCTGGAGTAGACACCAGAAGTCCAAG
    bov      A.T..TG.....C.....G.G..G...AA..GG.T.G..G.C...G.
    Consensus aGtGGtgGAGAACAAGGCTCcATTTCAGCAAgtGgCCCgGGAaaAGggAtCgGAgGcCCAgG

          850      860      870      880      890      900
    ----:----|----:----|----:----|----:----|----:----|----:----|
    rat      CATGGGCAGAGGAAGGCAGGCGTTGGGGGGCTGGAGGGGAGCAGAGCTGTCTGTTTTCCAG
    bov      .....T..GCA...A.A.GG..T..-..C...A...G.AG....C...C..C....
    Consensus CATGGGCAGtGGgcaGCAaGaGggGGtGGcTGcAGGaGAGgAagGCTGcCTGcTTcCCAG

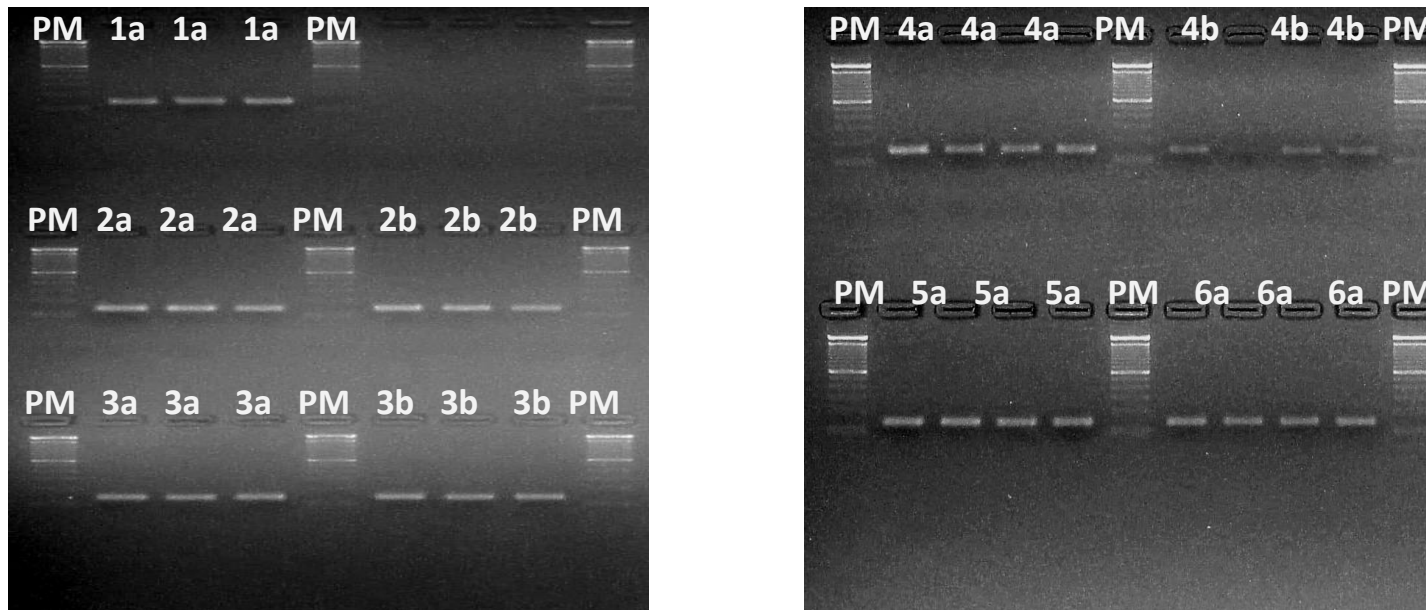
          910      920      930      940      950      960
    ----:----|----:----|----:----|----:----|----:----|----:----|
    rat      AAGCCCAAGGGTACAGATGGCGCCTGGGGGGGAAGTGAAGTGGAGGGGATAGATGGGCCTG
    bov      ...T...GA..C.....A.G--...A...C---...G.....CCAC-C..GCAAC.---
    Consensus AAGtCCAgAGGcACAGATaGggcCTGaGGGcgaaCTGgGTGGAccacacAGgcaacCctg

```

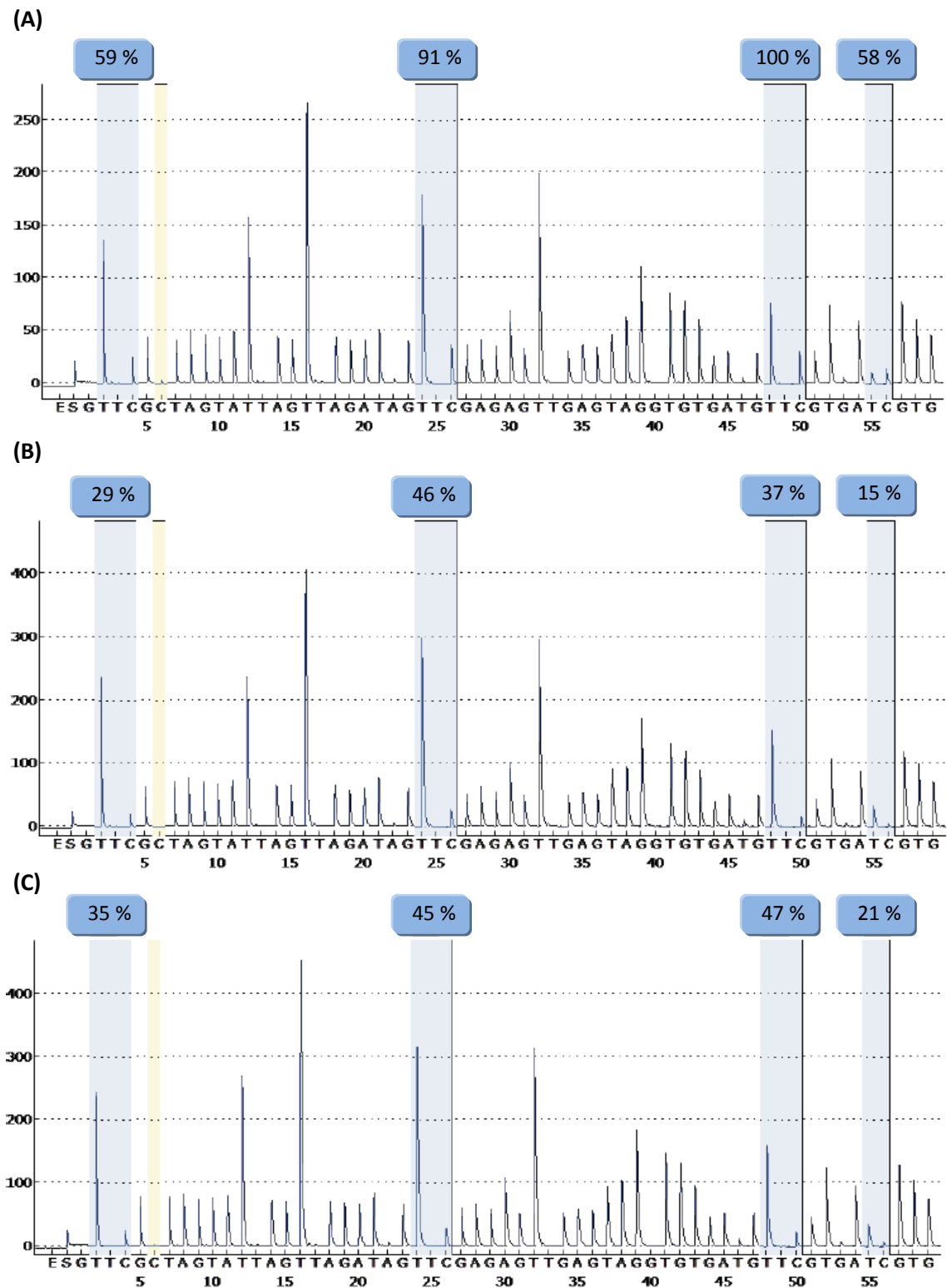
**Figure 1.** DNA partial sequence of the GFAP gene promoter region of rat (rat) (accession number: NC\_005109) and bovine (bov) (accession number: AF251845). Rat CpG sites are underlined. Bovine CpG sites are shaded. Bold-type nucleotides indicate the position of the four targeted CpG sites.

**Table 1.** DNA sequences and description of the primers used in this study.

Primers	Length (bp)	Sequence (5'→3')	Description	Target gene	Fragment length (bp)
<i>GFAP-UP-F3</i>	20	GTTAGGGTGGGTATAGAGTT	forward primer	GFAP	139
<i>GFAP-UP-RBIOT3</i>	28	AAAAACTATACTATTTTCATCCCAAATT	5'biotinylated reverse primer	GFAP	
<i>GFAP-UP-S4</i>	18	GTGGGTATAGAGTTTGTT	sequencing primer	GFAP	



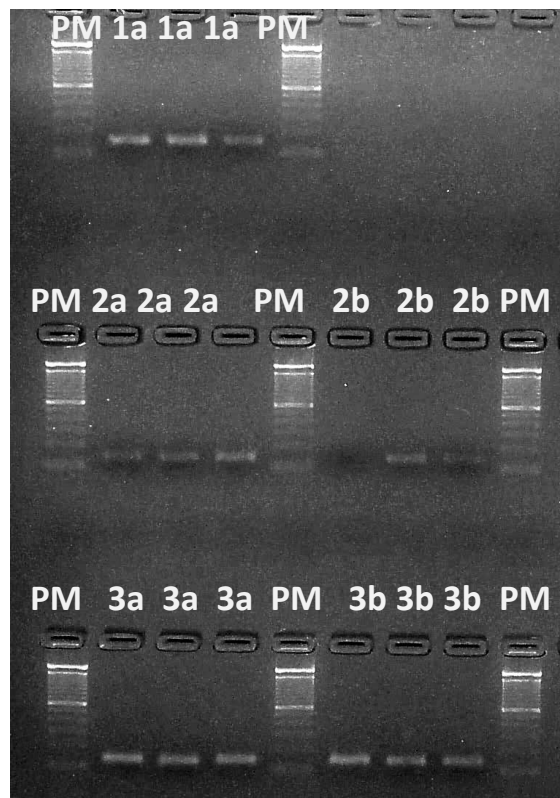
**Figure 2.** Electrophoretic analysis of the bovine glial fibrillary acidic protein (GFAP) PCR products (139 bp) obtained from (1a) muscle a, (2a) spinal cord a, (2b) spinal cord b, (3a) brain a, (3b) brain b, (4a) liver a, (4b) liver b, (5a) heart a, and (6a) milk a. PM= molecular weight marker.



**Figure 3.** Example of Pyrogram® and percent methylation values (highlighted in blue) obtained with the sequencing primers *GFAP-UP-S4* targeting bovine CpG sites 1-4 from (A) muscle, (B) spinal cord and, (C) brain PCR products.

**Table 2.** Methylation percentages of the 4 CpG sites targeted for three replicates from muscle, spinal cord and brain.

<b>Tissue type</b>	<b>Mean percent methylation±SD</b>			
<b>Muscle</b>	<b>CpG 1</b>	<b>CpG 2</b>	<b>CpG 3</b>	<b>CpG 4</b>
Replicate 1a	59	91	100	58
Replicate 1a	61	92	97	68
Replicate 1a	49	100	100	63
<i>Mean value</i>	<i>56.3±6.4</i>	<i>94.3±4.9</i>	<i>99.0±1.7</i>	<i>63.0±5.0</i>
<b>Spinal cord</b>				
Replicate 2a	29	46	37	15
Replicate 2a	36	59	55	25
Replicate 2a	35	47	50	27
<i>Mean value</i>	<i>33.3±3.8</i>	<i>52.0±6.2</i>	<i>51.7±2.9</i>	<i>23.7±4.2</i>
<b>Brain</b>				
Replicate 3a	35	45	47	21
Replicate 3a	31	45	46	25
Replicate 3a	27	41	39	20
<i>Mean value</i>	<i>31.0±4.0</i>	<i>43.7±2.3</i>	<i>44.0±4.4</i>	<i>22.0±2.6</i>



**Figure 4.** Electrophoretic analysis of the bovine glial fibrillary acidic protein (GFAP) PCR products (139 bp) from heat treated (1a) muscle a, (2a) spinal cord a, (2b) spinal cord b, (3a) brain a, and (3b) brain b. PM= molecular weight marker.



## ***IV. Resultados y Discusión***





#### IV.1. DETECCIÓN DE INGREDIENTES DE ORIGEN ANIMAL EN PIENSOS MEDIANTE TÉCNICAS DE PCR EN TIEMPO REAL

La prohibición de la Unión Europea (UE) de alimentar a rumiantes y otros animales de granja con proteínas derivadas de animales como medida preventiva para evitar la propagación de la Encefalopatía Espongiforme Bovina (EEB) y otras encefalopatías transmisibles, así como las normas orientadas a evitar el canibalismo en la alimentación de los animales, han potenciado la búsqueda y desarrollo de métodos analíticos rápidos y específicos que permitan identificar el origen animal de todas las materias primas e ingredientes presentes en los piensos (Comisión Europea, 2010).

El método oficial tradicionalmente empleado para la detección de componentes de origen animal en los piensos es el análisis microscópico. Esta técnica permite detectar la presencia en los piensos de un 0,1 % de proteínas animales, incluidas las tratadas a 133 °C y 3 bares de presión durante 20 minutos, así como distinguir los huesos de los animales terrestres de las espinas de los pescados. Sin embargo, la aplicación del análisis microscópico se encuentra limitada a la hora de diferenciar entre los huesos de mamíferos y de aves, o de cuantificar con un grado suficiente de precisión los componentes de origen animal en una muestra (van Raamsdonk y col., 2012; Veys y col., 2012; Veys y Berben, 2013). Con el objeto de mejorar la detección de determinados tipos de componentes de origen animal, o precisar más el origen de dichos ingredientes, en los últimos años se han desarrollado otros métodos alternativos al análisis microscópico. Entre ellos, los más extendidos son las técnicas espectrométricas, los ensayos inmunoenzimáticos y las técnicas genéticas (Gizzi y col., 2003a; van Raamsdonk y col., 2007; Fumière y col., 2009a).

Dentro de las técnicas genéticas, la metodología de PCR con cebadores especie-específicos diseñados para la amplificación selectiva de fragmentos de ADN de pequeño tamaño (50-150 pb) parece ser la alternativa más adecuada para el análisis de matrices complejas como los piensos, que contienen varias especies animales, y donde el ADN está fragmentado por los intensos tratamientos de procesamiento aplicados durante su fabricación (Colgan y col., 2001; Gao y col., 2003; Rodríguez y col., 2004b; Teletchea y col., 2005; Bellagamba y col., 2006; Fumière y col., 2006; Prado y col., 2007, 2009; Cawthraw y col., 2009; Yancy y col., 2009). Los ensayos de PCR clásicos, que se desarrollan en varios pasos desde la amplificación del material genético al análisis de los productos resultantes, han evolucionado hacia procedimientos más rápidos y automatizados en un solo tubo, entre los que destaca la técnica de PCR en tiempo real (Higuchi y col., 1993). Esta metodología presenta numerosas ventajas en relación a la PCR clásica aplicada al análisis rutinario de los alimentos y piensos. Entre ellas destaca la reducción del tiempo necesario para obtener resultados, al no requerir el análisis electroforético posterior de los productos de PCR. Además, al realizarse todo el proceso en el mismo tubo, se minimizan las posibilidades de contaminación con ADN exógeno y se facilita la automatización. Por otra parte, el equipo proporciona, en tiempo real (según transcurre la reacción de PCR), un resultado numérico que permite la

cuantificación y el tratamiento estadístico de los datos obtenidos (Brodmann y Moor, 2003; López-Calleja y col., 2007a, b; Zhang y col., 2007; Martín, 2011). En los últimos años, el número de trabajos de PCR en tiempo real desarrollados para la determinación del origen animal de los alimentos ha aumentado considerablemente (Köppel y col., 2008, 2009, 2011, 2013; Eugster y col., 2009; Kesmen y col., 2009, 2012, 2013; Teletchea, 2009; Ballin, 2010; Tsuruda y col., 2010; Bottero y Dalmaso, 2011; Dalmaso y col., 2011; Ali y col., 2012, 2014, 2015; Soares y col., 2013; Velasco y col., 2013; Cheng y col., 2014; Fang y Zhang, 2016). No obstante, los estudios de PCR en tiempo real publicados hasta el momento en el área del control de autenticidad de los piensos y sus ingredientes son, comparativamente, más escasos.

Debido al potencial de la técnica de PCR en tiempo real aplicada al análisis de piensos, en el transcurso del año 2012 el Laboratorio de Referencia para las Proteínas Animales en los piensos (EURL-AP, Bélgica) de la UE validó un nuevo método de detección de componentes de origen rumiante basado en esta metodología y desarrollado por la *Netherlands Organisation for Applied Scientific Research* (TNO, Países Bajos) (Fumière y col., 2012a). En consecuencia, la Unión Europea aprobó el Reglamento UE 51/2013, que modificó la anterior normativa sobre los métodos de análisis para la determinación de componentes de origen animal con fines de control oficial de los piensos, en la cual análisis microscópico se establecía como el único método oficial. El nuevo Reglamento UE 51/2013 propone ambas técnicas, la microscopía óptica y la PCR en tiempo real, como los métodos oficiales para realizar controles de rutina de los subproductos animales y los piensos compuestos que los contienen, a fin de verificar la inexistencia de material procedente de rumiantes. Sin embargo hay que señalar que, hasta la fecha, no existe un método de diagnóstico oficial para la detección y diferenciación específica de harinas de otros mamíferos, aves y especies de pescado, cuya utilización en los piensos para animales de abasto, salvo ciertas excepciones, está también prohibida.

Considerando todo lo anterior, este trabajo de investigación se ha centrado en el desarrollo y aplicación de técnicas de PCR en tiempo real con sondas TaqMan® para la detección de diferentes ingredientes de origen animal en piensos. Son objeto de este estudio las siguientes especies y grupos de especies: vaca (*Bos taurus*), oveja (*Ovis aries*), cabra (*Capra hircus*), grupo rumiante, cerdo (*Sus scrofa*), pollo (*Gallus gallus*), pavo (*Meleagris gallopavo*), pato (*Anas platyrhynchos* x *Cairina moschata*), oca (*Anser anser*), grupo aviar, caballo (*Equus caballus*), conejo (*Oryctolagus cuniculus*), liebre (*Lepus capensis*), grupo lepórido (conejo y liebre) y pescados.

A continuación se resumen los principales resultados obtenidos en la consecución de los objetivos planteados en esta Tesis Doctoral.

#### IV.1.1. DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE SISTEMAS DE PCR EN TIEMPO REAL

La identificación del origen animal de alimentos y piensos mediante técnicas de PCR exige, en primer lugar, una cuidadosa selección de los marcadores genéticos a utilizar. En este sentido, la mayoría de los trabajos publicados para la identificación de especies animales se basan en el análisis del genoma mitocondrial. Se trata de un ADN haploide y no recombinante, que no posee intrones y apenas tiene espacios intergénicos. Además, es mucho más pequeño que el ADN nuclear y cada célula posee miles de copias (Fumière y col., 2009a). Las características señaladas representan una ventaja frente a los marcadores nucleares, especialmente cuando se analizan matrices como los piensos, en los que los intensos tratamientos tecnológicos aplicados dificultan la obtención de suficientes copias de ADN de elevado tamaño molecular para su posterior amplificación y detección por PCR (Unsel y col., 1995). A su vez, el ADN mitocondrial posee una tasa de evolución de cinco a diez veces superior al ADN nuclear, cualidad que le confiere un apropiado nivel de variabilidad genética para la diferenciación interespecífica (Meyer, 1993). Los marcadores mitocondriales más utilizados para la detección de especies animales en alimentos y piensos son el gen que codifica para el citocromo b (Köppel y col., 2009; Cammà y col., 2012; Santos y col., 2012; Amaral y col., 2014; Ali y col., 2015), el gen 12S ARNr (Meyer y col., 2006; Girish y col., 2009; Martín y col., 2009a, b, c, 2010; Benedetto y col., 2011), el gen 16S ARNr (Chiappini y col., 2005; Frezza y col., 2008; Cawthraw y col., 2009; Yancy y col., 2009; Pascoal y col., 2011; Cammà y col., 2012; Natonek-Wisniewska y col., 2013), el gen citocromo oxidasa I (Hosseini y col., 2007; Herrero y col., 2010; Rasmussen y col., 2010; Natonek-Wisniewska y col., 2013; Kitpipit y col., 2014), las subunidades de la NADH deshidrogenasa (Infante y col., 2006; Kesmen y col., 2007, 2013; Rastogi y col., 2007), las subunidades de la ATPasa (Tasara y col., 2005; Fumière y col., 2006; Frezza y col., 2008; Kesmen y col., 2009; Yancy y col., 2009; Ali y col., 2015) y la región D-loop (Kotowicz y col., 2007; Mane y col., 2009; Sánchez y col., 2009; Karabasanavar y col., 2014). A pesar de que la mayoría de los estudios sobre autenticidad y trazabilidad de alimentos y piensos han empleado como marcador el ADN mitocondrial, también se han publicado trabajos que emplean genes nucleares como el gen que codifica la  $\alpha$ -actina (Hopwood y col., 1999; Rodríguez y col., 2003; Rastogi y col., 2007), el gen 5S ARNr (Infante y Manchado, 2006; Pinhal y col., 2008; Bektas y Belduz, 2009; Catanese y col., 2010) o el gen que codifica el receptor 1 de la melanocortina (MC1R) (Maudet y Taberlet, 2002; Evans y col., 2007; Mayer y Hochegger, 2011).

En esta Tesis Doctoral, los marcadores seleccionados para la detección de las especies animales objeto de estudio fueron la región polimórfica D-loop, incluida en la región control del ADN mitocondrial, y los genes mitocondriales que codifican las subunidades 12S y 16S del ARN ribosómico (ARNr), genes 12S ARNr y 16S ARNr, respectivamente. Estos marcadores presentan una longitud y una tasa de mutación adecuadas para la identificación de especies estrechamente relacionadas. La zona D-loop, en particular, tiene una elevada tasa de evolución debido a sustituciones,

adiciones y deleciones de nucleótidos, siendo la principal responsable de las variaciones en longitud que presenta el genoma mitocondrial (Cozzi y col., 2004; Lai y col., 2006).

Una vez elegidos los marcadores genéticos, se procedió al diseño de sistemas de cebadores y sondas TaqMan<sup>®</sup> que permitieran su amplificación mediante PCR en tiempo real. En primer lugar, y tras la alineación y análisis informático de las secuencias diana (genes 12S ARNr, 16S ARNr y región D-loop) de varias especies animales disponibles en las bases de datos *Genbank* del NCBI (*National Centre for Biotechnology Information*) y *EMBL* (*European Molecular Biology Laboratory*) del EBI (*European Bioinformatics Institute*), se diseñaron parejas de cebadores específicos para la detección diferencial de todas las especies y grupos de especies de interés. Hay que señalar que en el análisis de matrices sometidas a tratamientos térmicos intensos, el empleo de cebadores que delimiten fragmentos de pequeño tamaño es un factor especialmente crítico para el éxito de los ensayos de PCR en tiempo real. En el caso particular de los piensos destinados a animales de abasto, las tecnologías de transformación a las que deben someterse las proteínas animales para la destrucción de los priones (una temperatura de 133 °C y a una presión de 3 bares durante 20 minutos), fragmentan la molécula de ADN dificultando su amplificación por PCR. Por ello, para llevar a cabo la detección de las especies animales seleccionadas a partir de los piensos, en este trabajo se diseñaron cebadores específicos que delimitaban fragmentos de ADN cortos, desde 62 hasta 118 pb.

Además del diseño de los cebadores específicos, el estudio de los alineamientos nucleotídicos permitió elegir zonas internas a las secuencias de ADN delimitadas por los mismos, potencialmente adecuadas para el diseño de sondas de hidrólisis TaqMan<sup>®</sup> que permitieran la detección de las especies diana. Recientemente, se han desarrollado nuevos formatos de sondas TaqMan<sup>®</sup> que mejoran la detección de las secuencias de interés (Gašparič y col., 2010). Entre estas innovaciones destaca el empleo de *quencher* no fluorescentes (NFQ, *Non Fluorescent Quenchers*), moléculas que emiten una señal más limpia, mejorando la discriminación y facilitando la interpretación de los datos. En concreto, el *quencher* BBQ (BlackBerry<sup>®</sup> Quencher, Berry & Associates, Inc. Dexter, MI, USA), perteneciente a una nueva generación de NFQ, es una molécula capaz de absorber la energía de emisión de otros fluoróforos sin emitir señal detectable por sí misma, disminuyendo la fluorescencia de fondo de la reacción. Por otra parte, la incorporación a las sondas TaqMan<sup>®</sup> de bases LNA (*Locked Nucleic Acid*), análogos de ácidos nucleicos con ciertas modificaciones, confiere a las mismas una mayor afinidad por sus secuencias complementarias al aumentar su temperatura de fusión (Braasch y Corey, 2001; Costa y col., 2004). Considerando estos avances, para mejorar la hibridación y detección de las especies animales seleccionadas en este trabajo, las sondas TaqMan<sup>®</sup> diseñadas estaban marcadas en su extremo 5' con el fluorocromo 6-FAM (6-carboxi-fluoresceína), utilizado como *reporter*, y en 3' con el *quencher* no fluorescente BBQ. Asimismo, algunas de las sondas TaqMan<sup>®</sup> requirieron la incorporación de bases LNA.

En este trabajo se emplearon sistemas de cebadores y sondas específicos, tanto de especie (vaca, oveja, cabra, cerdo, pollo, pavo, pato, oca, conejo, liebre y caballo), como de grupos de especies (rumiantes, aves, pescados y lepóridos) para llevar a cabo la identificación y diferenciación precisa de ingredientes animales en piensos mediante PCR en tiempo real. Además, como control positivo de amplificación, se diseñó una pareja de cebadores universales de eucariotas y una sonda TaqMan® conservada en el gen 18S ARNr. La Tabla 9 incluye las secuencias nucleotídicas correspondientes a todos los sistemas de cebadores/sondas diseñados en este trabajo, así como el tamaño de los fragmentos de ADN amplificados a partir de los marcadores genéticos elegidos.

**Tabla 9.** Sistemas de PCR en tiempo real (cebadores y sondas TaqMan®) empleados para la detección de especies animales en piensos.

Diana	Nombre	Longitud (pb)	Secuencia (5'→3')	Marcador genético	Fragmento (pb)
<b>Vaca</b>	<i>BDLOOPDIR</i>	27	AACCAAATATTACAAACACCACTAGCT	D-loop	<b>76</b>
	<i>BDLOOPINV</i>	23	CCTTGCGTAGGTAATTCATTCTG		
	<i>BDLOOPP</i>	26	FAM-ACATAACACGCCCATACACAGACCAC-BBQ		
<b>Oveja</b>	<i>ODLOOPDIR</i>	21	ACTCCACAAGCCCACATAACA	D-loop	<b>77</b>
	<i>ODLOOPINV</i>	22	GGGTTTATGAACGCTCATGTCC		
	<i>ODLOOPP</i>	30	FAM-CATACAAGAAAAGCACAACCCACCCACCCAC-BBQ		
<b>Cabra</b>	<i>CDLOOPDIR</i>	26	CCCAATCCTAACCCTAGATACC	D-loop	<b>91</b>
	<i>CDLOOPINV</i>	20	TGTGTAGGCGAGCGGTGTAA		
	<i>CDLOOPP</i>	30	FAM-TGCATACACGTAATATTGTGTGGTGTGGC-BBQ		
<b>Rumiantes</b>	<i>RUM16SDIR</i>	17	TGGTTGTCCAGAAGATG	16S ARNr	<b>79</b>
	<i>RUM16SINV</i>	28	ACTTTTAAARMTACAGTGRRATTTATTT		
	<i>RUM16SP</i>	22	FAM-AGTTCAGCTTTAAARA+T+A+C+C+AA-BBQ		
<b>Cerdo</b>	<i>P12SDIR</i>	23	GTCACCCTCCTCAAGCATGTAGT	12S ARNr	<b>79</b>
	<i>P12SINV</i>	23	GTTACGACTTGTCTCTTCGTGCA		
	<i>P12SP</i>	22	FAM-ACCTATATTCA+ATT+A+CA+CAA+CC-BBQ		
<b>Pollo</b>	<i>CHDLOOPDIR</i>	20	AATCCCTCAAACCTATACAAA	D-loop	<b>63</b>
	<i>CHDLOOPINV</i>	30	ATGATAGAATAAACAATAATGTATATATAT		
	<i>CHDLOOPP</i>	15	FAM-ACGTT+TA+T+C+G+T+A+T+AA-BBQ		
<b>Pavo</b>	<i>TDLOOPDIR</i>	23	GCATAAAACCCACAAACAATAA	D-loop	<b>82</b>
	<i>TDLOOPINV</i>	27	GGGTTTCTCTAATAAAAAATAGCAAAAA		
	<i>TDLOOPP</i>	21	FAM-ACGTTTCGTTT+A+A+T+AT+A+T+A+CA-BBQ		

**Tabla 9 (continuación).** Sistemas de PCR en tiempo real (cebadores y sondas TaqMan®) empleados para la detección de especies animales en piensos.

Diana	Nombre	Longitud (pb)	Secuencia (5'→3')	Marcador genético	Fragmento (pb)
<b>Pato</b>	<i>D12SDIR</i>	24	GTGTAAGCTGAGTGATTGTTGGGGTT	12S ARNr	<b>118</b>
	<i>D12SINV</i>	24	TCAAGGTATAGCCTATGGAGTCGA		
	<i>D12SP</i>	28	FAM-TCGTAACAAGGTAAGTGTACCGGAAGGT-BBQ		
<b>Oca</b>	<i>G12SDIR</i>	24	TCAAGGTATAGCCTATGGAGTCGA	12S ARNr	<b>98</b>
	<i>G12SINV</i>	22	CTAAATCCGCCTTCCAGAAATG		
	<i>G12SP</i>	30	FAM-TATTCATAGGGCACACGGAAAGAAGCGTGA-BBQ		
<b>Aves</b>	<i>A12SDIR</i>	19	CAGTGAGCTCAATAGCMCC	12S ARNr	<b>68</b>
	<i>A12SINV</i>	16	CCCATTTCTYCCACCY		
	<i>A12SP</i>	19	FAM-CTATACCT+TGA+C+C+TGTCTT-BBQ		
<b>Pescados</b>	<i>12SpFISHDIR</i>	26	CCACCTAGAGGAGCCTGTTCTAGAAC	12S ARNr	<b>87</b>
	<i>12SpFISHINV</i>	21	GACGACGGCGGTATATAGGCG		
	<i>F12SP</i>	20	FAM-AACCCCGTTNAACCTCACC-BBQ		
<b>Conejo</b>	<i>R12SDIR</i>	21	GTAAGCTCAATTACCACCGTA	12S ARNr	<b>62</b>
	<i>R12SINV</i>	18	ATTGCTCTCCACTCTATG		
	<i>RH12SP</i>	15	FAM-AAACGTTAGGTCAAG-BBQ		
<b>Liebre</b>	<i>H12SDIR</i>	26	TATAAGTAAGCTTAATCATCACCATA	12S ARNr	<b>102</b>
	<i>H12SINV</i>	18	GCTTCCGTGTGTTCTAAA		
	<i>RH12SP</i>	15	FAM-AAACGTTAGGTCAAG-BBQ		
<b>Lepóridos</b>	<i>L12SDIR</i>	23	AACAATAAGCTGTAAAAAGTAA	12S ARNr	<b>75</b>
	<i>L12SINV</i>	20	TGAGTTCGAAGGGTATAAAA		
	<i>L12SP</i>	27	FAM-CACTTTTCGTGTTTTATTTTGTGTTGCA-BBQ		
<b>Caballo</b>	<i>Hr12SDIR</i>	18	GCCCTTGGGATGGAGAGA	12S ARNr	<b>73</b>
	<i>Hr12SINV</i>	23	GAGACTTTCGTCCGGGTAAAGT		
	<i>H12SP</i>	19	FAM-CTTGTTCTTAGGGTAGAAA-BBQ		
<b>Eucariotas</b>	<i>18SDIR</i>	16	TGGTGCCAGCAGCCGC	18S ARNr	<b>77</b>
	<i>18SINV</i>	25	TCCAACACGAGCTTTTAACTGCA		
	<i>18SP</i>	22	FAM-CGCTATTGGA+G+CT+G+GAATTACC-BBQ		

El símbolo + indica la posición de moléculas LNAs (*Locked Nucleic Acid*)  
 DIR: cebador directo; INV: cebador inverso; P: sonda TaqMan®



Una vez diseñados los sistemas de cebadores y sondas TaqMan<sup>®</sup> para las especies y grupos de especies seleccionadas, se llevó a cabo una evaluación exhaustiva de la especificidad de cada uno de ellos. En este sentido, dado que los piensos compuestos son matrices alimentarias complejas y heterogéneas que contienen diferentes especies en su composición, la especificidad de los ensayos debe ser evaluada frente a un número elevado de especies animales y vegetales para evitar posibles reacciones cruzadas y amplificaciones inespecíficas. No obstante, en los trabajos publicados que utilizan técnicas de PCR para determinar el origen animal de alimentos y piensos, los ensayos de especificidad emplean generalmente un número reducido de especies relacionadas con la especie diana. Por ejemplo, los cebadores de vaca diseñados por Tartaglia y col. (1998), y utilizados posteriormente por otros autores como Wang y col. (2000), Krcmár y Rencová (2001) y Myers y col. (2001) para la detección de harinas de vaca en piensos, demostraron su especificidad únicamente frente al ADN de las especies de vertebrados terrestres cuyos subproductos se emplean más frecuentemente en la fabricación de piensos: oveja, cerdo, caballo, conejo, pollo y pavo. Sin embargo, el número de trabajos en los que se amplían los ensayos de especificidad a otras especies presentes habitualmente en los piensos como los vegetales (Ha y col., 2006; Yoshida y col., 2009) o los pescados (Krcmár y Rencová, 2003; Dalmasso y col., 2004; Ha y col., 2006; Shinoda y col., 2008; Yoshida y col., 2009), son mucho más escasos. La especificidad de todos los sistemas de PCR en tiempo real diseñados en este trabajo se comprobó, tanto *in silico*, como mediante la amplificación por PCR del ADN extraído a partir de un amplio abanico de especies que incluía mamíferos (rumiantes y no rumiantes), especies de pescado, aves y vegetales. Como se observa en las siguientes tablas de resultados, los sistemas específicos de PCR en tiempo real permitieron la detección del fragmento esperado a partir del ADN de las correspondientes especies diana: vaca, oveja y cabra (Tabla 2, pág. 76), grupo de los rumiantes (Tabla 1, pág. 82), cerdo (Tabla 1, pág. 95), pollo, pavo, pato y oca (Tabla 1, pág. 106), grupo de las aves (Tabla 1, pág. 117), conejo, liebre y grupo de los lepóridos (Tabla 2, pág. 142) y caballo (Tabla 1, pág. 150). En el resto de especies animales y vegetales analizadas (heterólogas) no se generó señal positiva de amplificación tras 50 ciclos de PCR, demostrando la adecuada especificidad de todos los ensayos de PCR en tiempo real desarrollados. El empleo del control positivo de amplificación (cebadores y sonda de eucariotas del gen 18S ARNr), confirmó la presencia de ADN amplificable en todas las reacciones de PCR realizadas.

Tras comprobar la especificidad, se procedió a la validación de los sistemas de PCR en tiempo real con el fin de demostrar su idoneidad para la detección de componentes de origen animal en los piensos. Para ello, es fundamental disponer de muestras de piensos de referencia que reproduzcan las condiciones empleadas en la elaboración de los piensos animales, tanto en lo que se refiere a los ingredientes utilizados, como a los tratamientos térmicos aplicados en las plantas procesadoras. En este sentido, en esta Tesis Doctoral ha sido fundamental la colaboración establecida entre nuestro grupo de investigación y dos instituciones europeas que nos proporcionaron las muestras de pienso para los análisis: el Laboratorio Comunitario de Referencia para las Proteínas

Animales en los piensos (EURL-AP, *European Union Reference Laboratory for Animal Proteins in feedingstuffs*, CRA-W, *Centre Wallon de Recherches Agronomiques*, Gembloux, Bélgica) y el *Co-operative Central Laboratory* (CCL-NutriControl, Veghel, Holanda). Las muestras (en adelante, “piensos industriales”) consistían en proteínas animales transformadas procedentes de diferentes especies (rumiantes, cerdo, aves, y pescado). Estas proteínas estaban sometidas a diferentes tratamientos térmicos (125, 133, 137, 141, 145, o 159 °C durante 20 min a presión hiperbárica) y se encontraban, bien puras (100 %), o añadidas en distintas concentraciones (desde 0,1 hasta 5 %) a diferentes matrices vegetales y/o animales.

Los piensos industriales objeto de los ensayos preliminares de validación consistieron en una serie de muestras de referencia que contenían porcentajes y tratamientos térmicos conocidos de cada especie diana. Debido a la falta de disponibilidad de piensos industriales de todas las especies animales objeto de este trabajo, también se analizaron mezclas binarias experimentales de tejidos musculares tratados térmicamente (a 133 °C, 3 bares, 20 minutos), para la validación de los sistemas de PCR dirigidos a especies como la cabra, el pavo, el pato, la oca, el conejo, la liebre y el caballo. Estas mezclas binarias de referencia contenían porcentajes crecientes (0,1-25 %) del tejido diana tratado térmicamente en una matriz vegetal (avena), con el fin de reproducir lo más posible las condiciones empleadas en las plantas elaboradoras de piensos.

En todos los ensayos de validación de este trabajo, se realizaron tres extracciones de ADN independientes de cada porcentaje de las especies diana, bien a partir de las muestras de piensos industriales de referencia procedentes de los laboratorios europeos, o de las mezclas binarias elaboradas experimentalmente. Las muestras se analizaron por triplicado en los ensayos de PCR en tiempo real, y se construyeron rectas de calibración a partir de la representación del punto de corte ( $C_p$ , *Crossing Point*) obtenido frente al logaritmo de la concentración inicial de ADN de cada especie diana. Posteriormente, se determinó la eficiencia de amplificación, la linealidad y la sensibilidad de cada ensayo a partir de los datos de PCR en tiempo real obtenidos de las correspondientes rectas de calibración. Los parámetros estadísticos se evaluaron con el programa informático STATGRAPHICS Plus versión 5.0.

La eficiencia de amplificación, que indica la capacidad de la reacción de duplicar el número de copias de las cadenas de ADN en cada ciclo, se calculó a partir de las pendientes de las rectas de calibración estándar obtenidas para cada especie diana, de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$E = [10(-1/\text{pendiente}) - 1] * 100$$

La linealidad del modelo, es decir la capacidad de la técnica de PCR en tiempo real de obtener un aumento de fluorescencia directamente proporcional a la concentración de ADN presente en la muestra, se verificó mediante el análisis de la varianza (ANOVA). En este análisis, el valor “ $F$ ” representa estadísticamente la regresión, el

coeficiente de correlación " $r$ " representa estadísticamente la correlación entre los resultados obtenidos en el ensayo (valores de  $C_p$ ) y la concentración de la especie diana en las mezclas, mientras que el coeficiente de determinación " $r^2$ " expresa el grado de concordancia entre los datos experimentales y la recta teórica.

Las siguientes figuras muestran las rectas de calibración obtenidas con los sistemas de PCR en tiempo real específicos de vaca (Figura 1A, pág. 79), oveja (Figura 1B, pág. 79), rumiantes (Figura 1, pág. 87), cerdo (Figura 1, pág. 99), pollo (Figura 1A, pág. 112), aves (Figura 2, pág. 121) y pescados (Figura 2, pág. 132), a partir de las muestras de referencia procedentes de los laboratorios europeos. De forma similar, las Figuras 1 y 2, muestran las rectas estándar obtenidas en el análisis de las mezclas binarias de pavo, pato y oca (pág. 112), conejo, liebre (pág. 144) y caballo (pág. 152), mediante el empleo de los sistemas de PCR en tiempo real desarrollados en este trabajo.

En el momento presente, no existen valores de referencia armonizados para los criterios de validación de los ensayos de PCR en tiempo real aplicados a la detección de especies en alimentos y piensos. No obstante, el protocolo propuesto por Bustin y col. (2009) titulado "*Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments (MIQE)*" para la publicación de trabajos que emplean técnicas de PCR en tiempo real, así como el documento "*Definition of Minimum Performance Requirements for Analytical Methods of GMO Testing (Phase one)*" publicado por el *European Network of Genetically Modified Organism (GMO) Laboratories* (ENGL) para la validación de métodos de PCR en tiempo real aplicados a la detección y cuantificación de organismos modificados genéticamente (OMGs) (ENGL, 2008), establecen los siguientes criterios de aceptación: al menos una eficiencia de amplificación de la reacción de PCR entre 90 y 110 % (correspondiente a una pendiente entre -3,1 y -3,6), y un valor " $r^2$ " mayor o igual que 0,98. Como puede comprobarse, en todos los sistemas de PCR las pendientes de las rectas obtuvieron un valor cercano a -3,32, que corresponde a una eficiencia del 100 %, así como valores " $r^2$ " próximos a 1, indicando una concordancia plena entre los datos experimentales y los teóricos pertenecientes a las rectas de calibración obtenidas. Es conveniente señalar que, además de estos protocolos, existen otros publicados más recientemente como el documento del Codex Alimentarius para la detección específica de secuencias de ADN en alimentos mediante técnicas de PCR (CCMAS, 2010), así como la guía para la validación de métodos cualitativos de PCR en tiempo real en alimentos y piensos publicada por Broeders y col. (2014), que establecen los mismos parámetros y criterios de aceptabilidad.

En el marco de la detección de componentes de origen animal en piensos, es fundamental alcanzar un adecuado nivel de sensibilidad, de acuerdo con el límite de detección establecido por los métodos oficiales de la Unión Europea. En este sentido, la sensibilidad de las técnicas de PCR en tiempo real desarrolladas en este trabajo se determinó mediante el análisis de las muestras de referencia (piensos industriales y mezclas experimentales) que estaban sometidos a tratamientos que reproducían las condiciones de procesado reales aplicadas en las plantas transformadoras. La

sensibilidad, entendida como la concentración más baja de analito en una muestra que puede ser detectada de forma precisa se evaluó mediante el límite de detección (LOD, *Limit of Detection*) relativo de cada ensayo de PCR, a partir de muestras de piensos que contenían hasta 0,1 % de material diana tratado a diferentes temperaturas, en una matriz vegetal y/o animal. Sin entrar en las particularidades de cada ensayo, que se abordarán en el siguiente apartado, los resultados obtenidos evidenciaron que todos los sistemas de PCR en tiempo real desarrollados mostraron una sensibilidad y capacidad adecuadas para detectar el ADN diana en todas las muestras procesadas a los tratamientos mínimos exigidos por la Unión Europea (133 °C, 3 bares, 20 minutos), incluyendo aquellas que contenían el porcentaje más bajo (0,1 %).

Por otra parte, para evaluar la capacidad de las técnicas de PCR en tiempo real desarrolladas para cuantificar la presencia de ADN de las especies objeto de estudio, además de los parámetros de eficiencia, linealidad y sensibilidad, es necesario la evaluación de otros como la veracidad y la precisión (ENGL, 2008; Bustin y col., 2009). La veracidad, que expresa el grado de concordancia entre los resultados obtenidos con el método desarrollado y el valor que se acepta como verdadero o valor de referencia, debe establecerse en un intervalo específico del procedimiento analítico. Para comprobar la exactitud de los métodos de PCR en tiempo real, las reacciones de amplificación se llevaron a cabo por triplicado a partir de tres extracciones de ADN de diferentes muestras que contenían tres porcentajes distintos de cada especie diana. La veracidad de cada ensayo se expresó en forma de sesgo (%). El método se considera exacto cuando, para un determinado intervalo de linealidad, el valor de la medida de sesgo es de  $\pm 25$  % (ENGL, 2008). La precisión o el grado de dispersión de los resultados del análisis en torno a un porcentaje de concentración indica el error aleatorio del método. Cuando el método se lleva a cabo manteniendo siempre las mismas condiciones, la precisión atribuida a las diferentes fuentes de variación se conoce como repetibilidad. La repetibilidad de cada ensayo se evaluó comparando la desviación estándar de la repetibilidad media relativa (*RSDr*, *Relative Repeatability Standard Deviation*) de los valores obtenidos a partir de tres ensayos realizados en el mismo día. Los resultados obtenidos al evaluar la precisión de las técnicas mostraron, en la mayoría de los casos, valores de la *RSDr* inferiores o iguales al 25 %, de acuerdo con los límites establecidos por el protocolo de validación publicado por el ENGL (ENGL, 2008).

Los resultados obtenidos tras el análisis cuantitativo de los datos indicaron que las técnicas de PCR en tiempo real desarrolladas poseen el potencial para estimar la concentración de ADN de una muestra a partir del modelo teórico construido con las muestras de piensos de referencia.

#### IV.1.2. APLICACIÓN DE TÉCNICAS DE PCR EN TIEMPO REAL AL CONTROL DE AUTENTICIDAD DE PIENSOS

Una vez comprobada la idoneidad de las técnicas de PCR en tiempo real desarrolladas, se procedió a evaluar su aplicabilidad para la detección e identificación de las especies y grupos de especies animales de interés en muestras reales de piensos: vaca, oveja, cabra, grupo rumiante, cerdo, pollo, pavo, pato, oca, grupo aviar, pescados, y otras especies como caballo, conejo, liebre y grupo lepórido (conejo y liebre).

##### IV.1.2.1. Vaca, oveja, cabra y grupo rumiante

La mayoría de los ensayos de PCR diseñados para la detección de material animal prohibido en piensos se han dirigido a la detección de ADN bovino, siendo más escasos el número de trabajos que incluyen el análisis de otras especies rumiantes como la oveja o la cabra (Tartaglia y col., 1998; Krcmár y Rencová, 2001; Frezza y col., 2003; Toyoda y col., 2004; Martín y col., 2008). La primera parte de este trabajo de investigación se enfocó a la detección específica en piensos de ingredientes procedentes de las tres especies rumiantes de mayor interés comercial: vaca, oveja y cabra, mediante tres sistemas de PCR en tiempo real diseñados en la región mitocondrial D-loop (Tabla 9).

La aplicabilidad de los sistemas específicos de vaca y de oveja se evaluó mediante el análisis de 126 piensos industriales (trece muestras de referencia y el resto ciegas) elaborados por los dos laboratorios europeos (EURL-AP, Bélgica y CCL-NutriControl, Holanda) que nos suministraban las muestras. Los piensos consistían en harinas de diferentes tejidos bovinos y ovinos (músculo y carcasa) tratados a distintas temperaturas (desde 133 a 145 °C durante 20 min a presión hiperbárica), y se encontraban bien puras (100 %), o añadidas en distintas concentraciones a matrices vegetales y/o animales. Por otra parte, debido a la falta de disponibilidad de piensos industriales que contuvieran harinas de cabra, se analizaron dos mezclas binarias de referencia elaboradas experimentalmente con tejido muscular caprino tratado térmicamente (133 °C y 3 bares de presión durante 20 minutos) añadido a una matriz vegetal (avena).

Como se observa en la Tabla 3 (pág. 77), los sistemas específicos de vaca y oveja permitieron la detección del correspondiente ADN diana en todas las muestras de referencia que contenían concentraciones conocidas y crecientes (de 0,1 a 100 %) de harinas de carne y huesos de vaca (B1-B5) y oveja (O1-06) tratadas a 133 °C. Tras el análisis de las muestras de referencia, se evaluó la aplicabilidad de la técnica en las muestras de pienso de composición desconocida (ciegas), y los resultados obtenidos se contrastaron con los datos de composición real de los piensos, proporcionados posteriormente por los laboratorios de origen. Los sistemas especie-específicos de PCR en tiempo real desarrollados detectaron la presencia de vaca y/u oveja en el 100 % de las muestras ciegas que declaraban contener estas especies (42 de las 113, con valores de  $C_p$  comprendidos entre  $22,91 \pm 0,06$  y  $35,41 \pm 0,57$ ), a niveles de hasta un 0,1 %. Por otra parte, no se detectó señal positiva de amplificación en el resto de muestras ciegas analizadas (71) que no declaraban contener proteínas de rumiantes (resultados no

mostrados), demostrando así el potencial de la técnica para clasificar correctamente las muestras como positivas o negativas con relación al material rumiante analizado. Cabe señalar que, aunque los tratamientos de procesamiento aplicados a los piensos producen un daño indiscutible en la molécula de ADN (Colgan y col., 2001; Hird y col., 2003, 2006; Arslan y col., 2006), se registraron señales positivas de amplificación con el sistema específico de vaca, incluso en aquellas muestras sometidas a temperaturas de procesamiento de hasta 145 °C (Tabla 3, muestras S34, S67, S68 y S70). En este contexto, la corta longitud de los amplicones seleccionados minimizó los posibles fallos de amplificación por PCR debidos a la degradación del ADN.

Al contrario que los sistemas de PCR de vaca y oveja, el sistema específico de cabra no detectó la presencia de esta especie en ninguna de las muestras de pienso ciegas analizadas. Estos resultados concordaron también con los datos de composición suministrados por los dos laboratorios europeos, que reflejaban la ausencia de material caprino en la composición de los piensos. A pesar de que los resultados de sensibilidad obtenidos en el análisis de las mezclas binarias experimentales de tejido muscular de cabra en avena (C1 y C2) demostraron la capacidad de la técnica para detectar hasta un 0,1 % de la especie diana (Tabla 3, pág. 77), sería conveniente un análisis más exhaustivo en el que se pudiera contar con muestras de pienso que contuvieran harinas de cabra tratadas bajo las condiciones que se aplican en las industrias transformadoras.

Hay que señalar que todas las muestras de pienso analizadas con los sistemas de PCR específicos de vaca, oveja y cabra generaron señal positiva de amplificación con el sistema universal diseñado en el gen 18S ARNr, observándose una señal más tardía en aquellas muestras en las que las temperaturas de tratamiento aplicadas eran más intensas (resultados no mostrados). El empleo del control positivo de amplificación es importante para evitar una incorrecta interpretación de resultados falsos negativos que pudieran deberse a fenómenos de inhibición o a una baja calidad del ADN recuperado de una muestra (Lund y Madsen, 2006).

Una vez comprobado el potencial de los sistemas de PCR en tiempo real desarrollados para la detección cualitativa de las especies diana en los piensos, se procedió a evaluar si era posible establecer una relación cuantitativa entre el porcentaje de vaca y oveja presente en los mismos y el Cp obtenido en los ensayos, que permitiera estimar la concentración de material prohibido presente en una muestra problema. Para ello, se utilizó el método de la cuantificación absoluta con relación a la recta de calibración obtenida a partir de los valores de Cp de las muestras de referencia de las correspondientes especies diana (Figura 1, pág. 79). Los resultados recogidos en la Tabla 3 (pág. 77) indicaron una correlación positiva entre el porcentaje declarado y el porcentaje detectado de vaca y oveja en los piensos de referencia de origen bovino (B2-B5) y ovino (O1-O6), respectivamente, que contenían concentraciones crecientes de la especie diana incluidas en matrices idénticas, y estaban sometidas a una misma temperatura de procesamiento (133 °C). Sin embargo, al comparar los valores de Cp obtenidos en otras muestras de pienso de diferente composición, tratamiento y

procedencia, no pudo establecerse dicha correlación. Estos resultados ponen de manifiesto que, a pesar del potencial cuantitativo de las técnicas de PCR en tiempo real desarrolladas, la intensidad del tratamiento térmico aplicado a la muestra, así como el tipo de tejido presente, influyen en la eficiencia de amplificación de la PCR. El procesado térmico aplicado es uno de los factores más críticos que pueden afectar adversamente a la cantidad y calidad del ADN diana amplificable, originando incertidumbre en los resultados de cuantificación. Debido a que la legislación europea sólo especifica los requisitos mínimos de temperatura (133 °C) en el tratamiento de los subproductos animales, las condiciones reales de procesado (temperatura y presión) son susceptibles de variar en las diferentes plantas elaboradoras y, por ello, no es posible determinar el efecto exacto que la esterilización ejerce sobre los piensos. Además de la temperatura, los diferentes tejidos que pueden incorporarse a los piensos (músculo, carcasa, hueso, *etc.*) implican una serie de limitaciones que dificultan la cuantificación, ya que el número de células y, en consecuencia, de ADN mitocondrial amplificable, variará considerablemente dependiendo del origen y tipo de tejido presente en la muestra.

En consecuencia, y en consonancia con las observaciones de otros autores (Fumière y col., 2009a; Prado y col., 2009, 2012, 2013; Martín y col., 2010; Benedetto y col., 2011), la utilización de la técnica de PCR en tiempo real para la cuantificación de especies animales en piensos precisaría de la preparación de diferentes rectas de calibrado en función del procesado térmico de las muestras y del tipo de tejido analizado. Considerando la gran variedad de matrices que se utilizan en la preparación de los piensos compuestos, así como la variabilidad de los tratamientos térmicos aplicados en la industrias transformadoras, el empleo de la técnica de PCR en tiempo real para el análisis de harinas de carne y huesos quedaría limitado, desde un punto de vista práctico, a una detección cualitativa de las especies diana.

De forma complementaria a la detección específica de vaca, oveja y cabra, en este trabajo también se evaluó la aplicabilidad de una técnica de PCR en tiempo real para la detección conjunta del grupo de los rumiantes en piensos. En este caso, el sistema de cebadores y sonda TaqMan<sup>®</sup> se diseñó teniendo en cuenta las secuencias del gen 16S ARNr de vaca, oveja, cabra, así como de otras especies rumiantes como el ciervo (*Cervus elaphus*), gamo (*Dama dama*), corzo (*Capreolus capreolus*), rebeco (*Rupicapra rupicapra*), cabra montés (*Capra pyrenaica*) y muflón (*Ovis ammon*), cuya presencia en los piensos también está prohibida. Para ello, se analizó la batería de muestras de piensos industriales, de referencia y ciegas, incluidas en la Tabla 2 (pág. 83-85). Como en los ensayos anteriores, los resultados obtenidos al emplear el sistema de PCR del grupo rumiante en el análisis de las muestras problema, que contenían tejidos de vaca y/u oveja, se contrastaron con los datos de composición real de los piensos. Como muestra la Tabla 2, todas las muestras de pienso analizadas en cuya composición se declaraba la presencia de vaca y oveja (41,2 %), concordaban con las muestras en las que se detectó la presencia de material rumiante con la técnica de PCR en tiempo real desarrollada (con valores de  $C_p$  comprendidos entre  $23,08 \pm 0,06$  y

39,37±0,10). Aunque la intensidad del tratamiento térmico aplicado a la muestra, así como el tipo de tejido presente, influyeron en la señal de amplificación obtenida, la técnica de PCR permitió la detección de todas las muestras que contenían material rumiante, incluso de aquellas sometidas a temperaturas entre 137 y 145 °C (Tabla 2, muestras S76, S77, S78, S79, S81, S90, y S92).

Debido a la ausencia de material caprino en la composición de las muestras elaboradas por los laboratorios europeos, tampoco se pudo detectar ADN de cabra en ninguno de los piensos industriales analizados con el sistema de PCR del grupo rumiante. En este contexto, la mayoría de los trabajos publicados que utilizan técnicas de PCR para detectar material de origen rumiante en piensos incluyen el análisis de muestras procedentes de vaca y/u oveja (Tajima y col., 2002; Dalamasso y col., 2004; Kusama y col., 2004; Mendoza-Romero y col., 2004; Chiappini y col., 2005; Shinoda y col., 2008), y sólo un número limitado de estudios incluyen material de origen caprino en sus análisis (Bellagamba y col., 2003, 2006; Ha y col., 2006). En este ensayo, el sistema de PCR en tiempo real del grupo rumiante detectó con éxito la presencia de cabra en las mezclas binarias de referencia (C1 y C2) que contenían 0,1 y 1 % de la especie diana. Sin embargo, como se ha señalado anteriormente, las muestras analizadas estaban sometidas a una esterilización en autoclave a escala de laboratorio, tratamiento que no es extrapolable a los exigidos por la Unión Europea para las harinas animales. Por ello, sería conveniente un análisis más amplio en el que se pudiera contar con muestras de pienso que contuvieran harinas de cabra tratadas bajo las condiciones que se aplican en las industrias.

Por otra parte, en más de la mitad de las muestras ciegas analizadas (58,8 %) no se detectó la presencia de ADN rumiante, de acuerdo a los datos de composición que indicaban la presencia de otras especies animales diferentes a los rumiantes. Todas las muestras de pienso analizadas generaron señal positiva de amplificación con el sistema universal diseñado en el gen 18S ARNr.

El análisis de la recta de calibración obtenida a partir del modelo teórico construido con las muestras de piensos industriales de referencia, indicó una correlación positiva entre el porcentaje de material rumiante y los valores de  $C_p$  obtenidos (Figura 1, pág. 87). No obstante, de igual forma que en los ensayos de PCR específicos de vaca y oveja, los resultados obtenidos tras el análisis de las muestras ciegas no permitieron estimar de forma precisa el contenido de harinas de rumiantes en los piensos analizados. Por ejemplo, aquellas muestras de piensos industriales que contenían una misma concentración (0,1 %) de harinas de carne y huesos de vaca (Tabla 2, muestras S2, S12, S20, S27, S39, S43, S84, y S89) registraron señales de amplificación muy variables, con valores de  $C_p$  comprendidos entre  $29,61\pm0,08$  y  $37,82\pm0,12$ . Esta tendencia heterogénea también se observó tras el análisis de los piensos que contenían harinas de oveja. Por tanto, no se pudo establecer una correlación cuantitativa entre los valores de fluorescencia obtenidos en las muestras desconocidas (ciegas) y el contenido real de material rumiante presente en las mismas. Como ya se ha mencionado, tanto la



intensidad del tratamiento térmico aplicado a la muestra, como el tipo de tejido presente, influyen en la eficiencia de amplificación de las reacciones de PCR. En consecuencia, la utilización con fines cuantitativos de la técnica de PCR en tiempo real diseñada para el grupo rumiante también precisaría de la preparación de diferentes rectas de calibrado en función del procesado térmico de las muestras y del tipo de tejido analizado. Además, en este ensayo particular, la matriz de las muestras de referencia de material rumiante (RR1, compuestas por una mezcla de harinas de carne y huesos procedentes de vaca y oveja) difería de la de las muestras ciegas (que contenían en su mayoría material de un solo origen, ya sea ovino o bovino), por lo que la extrapolación en las rectas de calibrado de los valores de  $C_p$  de las muestras ciegas resulta aún más compleja.

En el marco de la detección y control de componentes de origen animal en piensos, el nivel de contaminación, ya sea ésta fraudulenta o accidental, puede ser bajo, y por tanto, los métodos analíticos deben alcanzar una adecuada sensibilidad y especificidad (Gizzi y col., 2003a). En este trabajo, tanto el sistema de PCR en tiempo real específico de vaca, oveja y cabra, como el del grupo rumiante, permitieron la detección de hasta un 0,1 % de material diana en los piensos, límite que se considera óptimo de acuerdo con el establecido en los métodos oficiales de la Unión Europea (Reglamento UE 51/2013, DOUE de 23 de enero de 2013). Otros trabajos basados en la metodología de PCR en tiempo real describen umbrales de detección similares o superiores a la hora de identificar la presencia de componentes de origen rumiante en los piensos (Krcmár y Rencová, 2005; Fumière y col., 2006; Frezza y col., 2008; Cawthraw y col., 2009; Yancy y col., 2009). Por ejemplo, Fumière y col. (2006) desarrollaron una técnica basada en la amplificación de un fragmento de 68 pb en una región comprendida entre el gen mitocondrial  $ARN^{Lys}$  y la subunidad 8 de la ATPasa, que permitió la detección de un 1 % de harinas de vaca tratadas a 133 °C en piensos compuestos. Asimismo, Frezza y col. (2008) detectaron hasta un 0,5 % de harinas de carne y huesos de vaca tratadas térmicamente (133 °C, 3 bares, 20 minutos) en piensos comerciales, mediante una técnica de PCR en tiempo real que empleaba una pareja de cebadores específicos y una sonda diseñados en el gen mitocondrial 16S ARNr. Yancy y col. (2009) utilizaron el intercalador fluorescente SYBR<sup>®</sup> Green en un sistema de PCR en tiempo real para detectar ADN de vaca en piensos. El análisis permitió la detección de un 0,1 % de harinas de carne y huesos bovinas tratadas entre 125-131 °C durante 30 minutos. Cawthraw y col. (2009) detectaron un 0,1 % de vaca en harinas de carne y huesos tratadas a 133 °C, 3 bares, 20 minutos, mediante una técnica de PCR en tiempo real basada en una pareja de cebadores específicos y una sonda TaqMan<sup>®</sup> diseñados en el gen 16S ARNr.

Es importante remarcar que todos los piensos industriales analizados en este trabajo reproducían las condiciones de procesado dictadas por la Unión Europea para la elaboración de piensos. Por ello, uno de los avances de este trabajo de investigación ha radicado en demostrar la aplicabilidad de las técnicas de PCR en tiempo real desarrolladas para la detección específica de vaca, oveja, cabra y grupo de los rumiantes,

a través de un muestreo amplio y realista de las materias primas que se emplean en la elaboración de los piensos compuestos. Por el contrario, muchos de los trabajos publicados en este área (Dalmasso y col., 2004; Kusama y col., 2004; Mendoza-Romero y col., 2004; Ha y col., 2006) analizan harinas animales elaboradas experimentalmente en el laboratorio, y sólo unos pocos estudios incluyen una representación de muestras que reproduzcan las condiciones reales aplicadas a los componentes animales en las plantas procesadoras. Además, estos últimos trabajos están fundamentalmente dirigidos a la detección de harinas de vaca, y no incluyen el análisis de otras especies rumiantes que también pueden encontrarse como ingredientes en los piensos (Krcmár y Rencová, 2001; Frezza y col., 2003; Prado y col., 2009). Por otro lado, la gran parte de los estudios dirigidos a la detección de especies rumiantes en piensos han empleado técnicas de PCR convencional, procedimiento que implica una serie de limitaciones en comparación con los ensayos de PCR en tiempo real, como una menor sensibilidad, mayor riesgo de contaminación con ADN exógeno, y necesidad de procesamiento post-amplificación, con el consiguiente aumento en el tiempo de análisis (Brodmann y Moor, 2003; Zhang y col., 2007; Martín, 2011).

Teniendo en cuenta los resultados alcanzados en esta parte del trabajo, puede afirmarse que los sistemas de PCR en tiempo real específicos de vaca, oveja, cabra y grupo rumiante constituyen herramientas rápidas y sensibles, que podrían emplearse de forma complementaria a otros métodos de la Unión Europea para detectar con precisión el material prohibido de origen rumiante en piensos para animales de abasto.

#### **IV.1.2.2. Cerdo y aves**

Actualmente, las proteínas animales transformadas, cuya utilización en los piensos para animales de abasto está prohibida, se aprovechan para otros usos como fertilizantes, compost o carburante, así como ingredientes en alimentos para las dietas de animales de compañía. Sin embargo, pueden constituir una fuente de proteínas de calidad en la alimentación de animales de granja. Por ello, en diciembre de 2009, la Comisión Europea solicitó a la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) una actualización de la evaluación cuantitativa del riesgo que supondría la incorporación de pequeñas cantidades de proteínas animales transformadas en los piensos (Comisión Europea, 2010). Considerando que la transmisión de la Encefalopatía Espongiforme Bovina (EEB) de especies no rumiantes a otros no rumiantes es muy poco probable (EFSA, 2007a, b), cabría plantear la reintroducción en la cadena alimentaria animal de las proteínas animales transformadas procedentes de no rumiantes, sin suprimir la prohibición de reciclaje dentro de la misma especie (por ejemplo, la harina de carne y huesos procedente de aves de corral podría suministrarse a los cerdos, y la de porcinos a las aves de corral) (Comisión Europea, 2010). Esta medida contribuiría a reducir el creciente déficit proteico que afecta al sector de los piensos, pero conllevaría asimismo la necesidad de introducir niveles de tolerancia de proteínas animales transformadas en los piensos destinados a los animales de abasto. En consecuencia, el informe de la EFSA establece como condición principal para un posible levantamiento

del veto a las harinas cárnicas en especies no rumiantes, disponer de técnicas analíticas validadas que permitan determinar el origen de las especies presentes (e.g. cerdos y aves) en los piensos que contienen proteínas animales transformadas (EFSA, 2011).

Como ya se ha señalado, en el transcurso del año 2012, el Laboratorio de Referencia para las Proteínas Animales en los piensos (EURL-AP, Bélgica) de la Unión Europea validó un método de detección de material procedente de rumiantes basado en la técnica de PCR en tiempo real para el control rutinario de los piensos en la Unión (Fumière y col., 2012a, b). Sin embargo, en la actualidad no existe ningún método de diagnóstico oficial que pueda diferenciar entre el material procedente de porcinos y el de aves de corral en los piensos. Teniendo en cuenta todos estos antecedentes, además de las especies rumiantes previamente descritas, en este trabajo se ha abordado la detección específica mediante PCR en tiempo real con sondas TaqMan<sup>®</sup> de animales no rumiantes como el cerdo y varias especies de aves (pollo, pavo, pato y oca) en piensos.

La aplicabilidad del sistema de PCR en tiempo real diseñado en el gen 12S ARNr para la detección específica de cerdo se evaluó mediante el análisis de 190 piensos industriales (diecinueve muestras de referencia y el resto ciegas) elaborados por el laboratorio CCL-NutriControl (Holanda) (Tabla 3, pág. 97-98). Las muestras consistían en harinas animales de origen porcino, aviar y rumiante tratadas a temperaturas entre 133 y 159 °C durante 20 min a presión hiperbárica. El material porcino se encontraba bien puro (100 %), o añadido en distintas concentraciones a matrices vegetales y/o animales. Los resultados obtenidos tras el análisis de las muestras de referencia, evidenciaron la capacidad de la técnica para detectar hasta un 0,1 % de harinas de diferentes tejidos diana (huesos, intestinos, carcasa, y músculo) tratados a 133 °C. Sin embargo, se registraron valores de  $C_p$  variables en función del tipo de tejido analizado. Por ejemplo, para una misma concentración de material porcino (1 %), se obtuvieron valores de  $C_p$  de  $23,03 \pm 0,03$ ,  $24,79 \pm 0,00$ ,  $30,48 \pm 0,02$  y  $34,69 \pm 0,01$  en las muestras que contenían huesos, intestinos + huesos, carcasa, y músculo de cerdo, respectivamente.

Una vez demostrada la capacidad de la técnica para detectar en los piensos hasta un 0,1 % del tejido diana tratado a 133 °C, se estudió la influencia de unas condiciones de temperatura más extremas en la sensibilidad de los ensayos. Para ello, se analizaron el resto de muestras de referencia que contenían harinas de carcasa y de músculo de cerdo (0,2 %) sometidas a diferentes tratamientos térmicos (137, 141, y 145 °C). Como se observa en la Tabla 3 (pág. 97-98), el sistema de PCR específico de cerdo generó señal positiva de amplificación en todas las muestras, si bien a medida que aumentaba la temperatura de tratamiento se registraban valores de fluorescencia más tardíos, limitando la sensibilidad de la técnica en las muestras sometidas a temperaturas de procesamiento más elevadas (145 °C). Tras los ensayos preliminares con las muestras de referencia conocidas, se procedió al análisis de las 171 muestras ciegas (tratadas a temperaturas de 133 a 159 °C y que contenían distintas concentraciones de tejidos animales procedentes de huesos, intestinos, carcasa, y músculo). Concluidos los análisis, el laboratorio de origen proporcionó los datos de composición real y tratamiento

aplicado a cada muestra desconocida analizada, corroborándose que, al igual que sucedía en los piensos de referencia, la intensidad del tratamiento térmico aplicado, así como el tipo de tejido presente en las muestras ciegas, influían en la señal de amplificación de la PCR (Tabla 3, pág. 97-98). De forma general, las muestras de pienso analizadas en cuya composición se declaraba la presencia de cerdo (91), concordaban en un 100 % con las muestras en las que se detectó la presencia de esta especie al emplear la técnica de PCR en tiempo real desarrollada (con valores de  $C_p$  comprendidos entre  $13,63 \pm 0,27$  y  $43,96 \pm 0,05$ ). No obstante, se registraron señales de amplificación tardías ( $> 40$ ) en dos muestras que contenían pequeños porcentajes de tejido diana (0,1 %) y que estaban tratadas a 145 °C (S97 y S106), reflejando un nivel de degradación del ADN mucho mayor comparado con las muestras tratadas a temperaturas menos elevadas. Por otra parte, no se detectó la presencia de cerdo en el 47 % de las 171 muestras ciegas analizadas, corroborando los datos de composición que indicaban la presencia en estas muestras de otras especies animales diferentes al cerdo (aves, rumiantes y pescados), y evidenciando el potencial de la técnica para discriminar correctamente las muestras positivas de las negativas (resultados no mostrados). Todas las muestras de pienso analizadas generaron señal positiva de amplificación con el sistema universal diseñado en el 18S ARNr (Tabla 3).

Los resultados obtenidos demostraron el potencial de la técnica de PCR en tiempo real específica de cerdo para la detección cualitativa de pequeños porcentajes de material porcino, incluso en muestras sometidas a tratamientos térmicos superiores a 133 °C. Asimismo, el análisis de la recta de calibración indicó el potencial cuantitativo de la técnica, dada la correlación positiva entre el porcentaje de la especie diana y los valores de  $C_p$  obtenidos a partir del modelo teórico construido con las muestras de referencia (Figura 1, pág. 99). No obstante, al igual que ocurrió en los ensayos anteriores, la cuantificación del contenido de ADN de cerdo en los piensos industriales no fue posible. Como ya se ha señalado, debido a que la legislación europea sólo especifica los requisitos mínimos de temperatura (133 °C) en el tratamiento de los subproductos animales, el efecto exacto de la esterilización no se puede determinar. Así, la diferencia en los tratamientos térmicos aplicados es uno de los factores críticos que pueden afectar adversamente a la cantidad y calidad del ADN diana amplificable, originando incertidumbre en la cuantificación (Fumière y col., 2009a; Prado y col., 2009, 2012, 2013; Martín y col., 2010; Benedetto y col., 2011). No obstante, y aunque sólo se emplease con fines cualitativos, para demostrar la aplicabilidad de las técnicas de PCR en tiempo real es necesario analizar una representación de muestras tratadas bajo las condiciones de procesado que utilizan las industrias transformadoras. En este sentido, el sistema de PCR en tiempo real específico de cerdo desarrollado en este trabajo detectó con éxito la amplia selección de tejidos porcinos tratados a 133, 137, 141, 145 o 159 °C durante 20 min a presión hiperbárica.

Como ya se ha indicado, además de la temperatura, los diferentes tejidos y, en consecuencia, la concentración de mitocondrias y ADN mitocondrial presente en cada célula, conlleva una serie de limitaciones a la hora de obtener resultados cuantitativos.

Como se observa en la Tabla 3 (pág. 97-98), el material porcino que contenía tejidos óseos (huesos e intestinos + huesos) registró valores de  $C_p$  más bajos que aquel que contenía otros tejidos como carcasa y músculo, a una misma temperatura de procesado. Estos resultados concuerdan con otros trabajos en los que se describe una mayor preservación del ADN en los huesos, en comparación con otros tejidos. La adsorción de la molécula de ADN a los cristales de la matriz de hidroxiapatita, así como el efecto protector del colágeno, parecen tener un papel crucial en la conservación o resistencia de los ácidos nucleicos dentro del hueso (Collins y col., 2002; Götherström y col., 2002; Fumière y col., 2009a).

Como resultado de todas estas observaciones, una muestra desconocida que contuviera un alto porcentaje de material animal prohibido tratado a una temperatura superior a 133 °C (e.g. muestra S15, 159 °C) podría ser identificada erróneamente como otra con una menor cantidad de tejido diana, pero tratada a una temperatura inferior (e.g. muestra R6, 133 °C). Esta confusión podría ser problemática en el contexto del actual debate de la Comisión Europea en torno a la derogación de la norma de “tolerancia cero”, una vez se permitiera la presencia de material procedente de porcinos o de aves de corral en los piensos.

Hasta la fecha, el número de trabajos publicados sobre metodologías de PCR en tiempo real aplicadas a la detección de harinas de carne y huesos de especies monogástricas como el cerdo es comparativamente mucho menor que los descritos para la detección de harinas de especies rumiantes en piensos (Krcmár y Rencová, 2005; Bellagamba y col., 2006; Fumière y col., 2006; Frezza y col., 2008; Cawthraw y col., 2009). Entre ellos, Krcmár y Rencová (2005) detectaron la presencia de un 0,01 % de ADN de cerdo en harinas de animales terrestres tratadas a 133 °C durante 20 minutos, mediante un ensayo de PCR en tiempo real empleando un sistema de cebadores y sonda TaqMan<sup>®</sup> diseñado en el genoma mitocondrial. Asimismo, el diseño de un sistema de cebadores específicos de cerdo y una sonda TaqMan<sup>®</sup> en los genes ARNt<sup>lys</sup> y ATPasa8 permitió a Fumière y col. (2006) detectar un 0,1 % de harinas de carne y huesos de cerdo tratadas a 134 °C durante 20 minutos. Bellagamba y col. (2006) utilizaron también un sistema de cebadores y sonda TaqMan<sup>®</sup> específico de cerdo diseñado en el gen que codifica la proteína del prión (PRNP), para detectar hasta 10 pg de harinas de esta especie tratadas a 130 °C y 2 bares de presión durante 40 minutos. Frezza y col. (2008) diseñaron un ensayo de PCR en tiempo real con sondas FRET en el gen citocromo b, que permitió la detección de un 0,5 % de harinas de cerdo sometidas a 133 °C, 3 bares, 20 minutos. Cawthraw y col. (2009) desarrollaron una técnica de PCR en tiempo real con cebadores específicos y una sonda TaqMan<sup>®</sup> diseñados en el gen 16S ARNr para detectar hasta un 0,1 % de harinas de carne y huesos de cerdo tratadas a 133 °C y 3 bares de presión durante 20 minutos.

Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran el gran potencial de la técnica de PCR en tiempo real específica de cerdo desarrollada, especialmente si se compara con otros trabajos publicados para la detección de esta especie en harinas animales, la

mayoría de los cuales analizan muestras que no reproducen las condiciones reales de procesamiento de los piensos, o bien no especifican de forma exacta el origen y/o la composición de los mismos (Colgan y col., 2001; Tajima y col., 2002; Dalmasso y col., 2004; Bellagamba y col., 2006). Puede concluirse que la técnica de PCR en tiempo real específica de cerdo permite detectar de forma rápida y sensible la presencia de hasta 0,1 % de material porcino, incluso en aquellas muestras sometidas a tratamientos térmicos superiores a 133 °C.

En el marco de la posible reintroducción en la cadena alimentaria de proteínas animales transformadas procedentes de especies no rumiantes, y al igual que en el caso de las harinas porcinas, es también necesario el desarrollo de técnicas analíticas que permitan determinar la presencia de ingredientes aviares en los piensos. Por ello, en este trabajo se desarrollaron técnicas de PCR en tiempo real con sondas TaqMan® para la detección específica de cuatro especies de aves de importancia comercial: pollo, pavo, pato y oca. Además, se desarrolló un sistema de PCR en tiempo real para la detección conjunta de éstas y otras especies pertenecientes a la clase aviar susceptibles también de emplearse en la elaboración de harinas cárnicas.

Dado el volumen de producción mundial de carne de pollo (*Gallus gallus*), en especial de los pollos de engorde, esta constituye la especie avícola de mayor interés comercial en comparación con otras aves domésticas como el pavo, el pato o la oca. La técnica de PCR en tiempo real específica de pollo diseñada en la región D-loop se evaluó mediante el análisis de 69 piensos de diferente composición y tratamiento (veintiún muestras de referencia y el resto de composición desconocida) elaborados industrialmente por el laboratorio CCL-NutriControl (Holanda). Como se observa en la Tabla 3 (pág. 109-110), el sistema de PCR específico de pollo permitió la detección del ADN diana en todas las muestras de referencia que contenían concentraciones crecientes (de 0,1 a 100 %) de harinas de huesos (R1-R5), carcasa (R6-R11), y músculo (R12-R16) de pollo tratadas a 133 °C. De forma similar a los trabajos anteriores, los resultados obtenidos indicaron que el tipo de tejido analizado (huesos, carcasa o músculo) influía claramente en los valores de  $C_p$  obtenidos, evidenciando una menor degradación en el ADN procedente del tejido óseo comparado con el ADN de carcasa y músculo, a una misma temperatura de procesamiento (133 °C). En este contexto, la mayor preservación del ADN en los huesos, donde los procesos de sorción mineral estabilizan la molécula de ADN (Collins y col., 2002; Götherström y col., 2002; Fumière y col., 2009a), podrían explicar los valores de  $C_p$  más bajos obtenidos en las harinas que contenían tejido óseo (huesos) con respecto a las que contenían otros tejidos (carcasa y músculo).

Los resultados obtenidos con el resto de muestras de referencia, tratadas a temperaturas superiores a 133 °C (Tabla 3, R17-R21) indicaron que, a medida que aumentaba la intensidad del tratamiento térmico, se producía una disminución de la cantidad de ADN diana detectado, limitando la sensibilidad de la técnica en aquellas muestras sometidas a elevadas temperaturas de procesamiento (145 °C).

Con relación a las muestras ciegas, el sistema de PCR específico de pollo detectó satisfactoriamente todos los piensos tratados a 133 °C que declaraban contener esta especie. Asimismo, el ensayo detectó la presencia de pollo en todas las muestras ciegas tratadas a 137 y 141 °C, incluso a la concentración más baja analizada (0,1 %), excepto en el músculo de pollo, donde el límite de detección fue del 1 %. Sin embargo, se obtuvieron valores de  $C_p$  tardíos ( $> 40$ ) en la amplificación de algunas de las muestras positivas tratadas a 137 y 141 °C, lo que evidencia el alto grado de degradación del ADN a estas temperaturas. Además, en las muestras sometidas a la temperatura más elevada (145 °C), la detección sólo fue posible en las harinas puras (100 % de diana) (Tabla 3, pág. 109-110).

En consonancia con los datos de composición real de las muestras desconocidas, no se detectó señal positiva de amplificación en los piensos industriales (5 de 48) que no declaraban contener proteínas de aves (resultados no mostrados), demostrando el potencial de la técnica para discriminar correctamente las muestras positivas de las negativas. Todas las muestras de pienso analizadas generaron señal positiva de amplificación con el sistema universal diseñado en el gen 18S ARNr.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, se puede concluir que, en función del tipo de tejido analizado, a medida que el procesado térmico aumenta por encima de los requisitos mínimos legales de temperatura (133 °C), la señal de fluorescencia ( $C_p$ ) obtenida será mayor, alcanzando un umbral por encima del cual la detección ya no es posible (*i.e.* muestras clasificadas como “no detectadas” en la Tabla 3). No obstante, esta limitación podría considerarse más bien teórica, ya que existen razones tanto económicas (costes energéticos) como nutricionales (destrucción de ciertos aminoácidos) que previenen a las plantas procesadoras de exceder el valor mínimo legal (133 °C) establecido para la esterilización de los subproductos animales. Asimismo, por motivos de seguridad, los límites de presión de la mayoría de los equipos de esterilización son tales que solo una minoría de las fábricas utilizan temperaturas por encima de 133 °C (Gizzi y col., 2003a). Los resultados obtenidos concuerdan con los de otros estudios que describen la influencia de los tratamientos de esterilización agresivos en la sensibilidad de los ensayos de PCR a la hora de detectar proteínas animales procesadas a temperaturas de hasta 141 °C (Chiappini y col., 2005; Fumière y col., 2006). Sin embargo, estos trabajos se centran fundamentalmente en la detección de especies rumiantes, existiendo menos trabajos publicados para aves. Entre ellos, el sistema de cebadores y sonda TaqMan<sup>®</sup> específico de pollo diseñados por Krcmár y Rencová (2005) en el genoma mitocondrial permitió la detección de un 0,01 % de ADN de la especie diana en harinas de tratadas a 133 °C. Bellagamba y col. (2006) desarrollaron una técnica de PCR en tiempo real en el gen que codifica la proteína del prión (PRNP) para detectar hasta 10 pg de ADN de pollo en muestras tratadas a 130 °C y 2 bares de presión durante 40 minutos. Frezza y col. (2008) diseñaron una pareja de cebadores específicos en el gen mitocondrial de la subunidad 8 de la ATPasa para detectar un 0,5 % de harinas de pollo tratadas a 133 °C y 3 bares de presión durante 20 minutos. Cawthraw y col. (2009) emplearon un sistema específico de pollo en el gen 16S ARNr que detectó hasta

un 0,1 % de harinas de carne y huesos de esta especie tratadas a 133 °C y 3 bares de presión durante 20 minutos. En el contexto de todos estos estudios, uno de los valores diferenciales del sistema de PCR específico de pollo desarrollado en este trabajo ha consistido en demostrar su aplicabilidad para la detección de bajas concentraciones de harinas de aves en una gran variedad de piensos industriales de diferente composición y tratamiento de procesado, incluyendo muestras tratadas a temperaturas extremas (hasta 145 °C).

Además del pollo, existen otras especies avícolas como el pavo, el pato y la oca susceptibles de formar parte de la composición de las harinas cárnicas destinadas a la alimentación del ganado. Por ello, las muestras ciegas analizadas con el sistema de PCR en tiempo real específico de pollo, también se analizaron con los sistemas de PCR diseñados en este trabajo para la detección específica de pavo (región D-loop), pato (gen 12S ARNr) y oca (gen 12S ARNr). Los resultados obtenidos corroboraron la información suministrada por el laboratorio de origen, reflejando la ausencia de material procedente de estas especies en la composición de los piensos, a excepción de tres muestras: S18, S65, y S66 (Tabla 4, pág. 111), en las que el sistema específico de pavo detectó satisfactoriamente la presencia de esta especie. Aunque los resultados de sensibilidad obtenidos en el análisis de las mezclas binarias de referencia indicaron la capacidad de la técnica de PCR en tiempo real para detectar hasta un 0,1 % de tejido muscular de pavo, pato y oca, sería necesario un análisis más amplio que incluyera harinas de estas especies tratadas bajo las condiciones que se aplican en las industrias transformadoras, con el fin de demostrar la aplicabilidad de los ensayos en muestras reales.

La mayoría de trabajos sobre detección de harinas aviares mediante PCR en tiempo real, están enfocados específicamente al pollo, describiendo límites de detección comprendidos entre el 0,5 y el 0,01 % (Krcmár y Rencová, 2005; Bellagamba y col., 2006; Frezza y col., 2008; Cawthraw y col., 2009). En este sentido, la disponibilidad de técnicas de PCR como las desarrolladas en este trabajo, capaces de identificar la especie animal concreta presente en los piensos, será crucial bajo el posible escenario donde se autoricen de nuevo las harinas cárnicas procedentes de especies no rumiantes en la alimentación animal (EFSA, 2011).

Además de los ensayos de PCR especie-específicos para la detección de pollo, pato, pavo y oca, es conveniente disponer de una técnica para la detección común y simultánea de varias especies de aves, que pueda emplearse como un análisis complementario a los sistemas de PCR individuales en la detección de proteínas transformadas de origen aviar en los piensos. Por ello, en esta Tesis Doctoral se desarrolló una técnica de PCR en tiempo real basada en el gen 12S ARNr para la detección conjunta de varias especies de aves pertenecientes a los órdenes Galliformes, Anseriformes y Struthioniformes: pollo (*Gallus gallus*), pavo (*Meleagris gallopavo*), codorniz (*Coturnix coturnix*), faisán (*Phasianus colchicus*), perdiz (*Alectoris rufa*), pintada (*Numida meleagris*), pato (*Anas platyrhynchos* × *Cairina moschata*), oca



(*Anser anser*) y avestruz (*Struthio camelus*). La técnica de PCR se empleó en el análisis de sesenta muestras de piensos industriales (dieciséis muestras de referencia y el resto de composición desconocida) elaborados por el laboratorio CCL-NutriControl (Holanda), que contenían concentraciones crecientes (de 0 a 100 %) de proteínas transformadas de aves procedentes de distintos tejidos (huesos, carcasa, músculo, plumas e intestinos), tratadas de 125 a 145 °C durante 20 min a presión hiperbárica (Tabla 2, pág. 118).

De forma general, los resultados obtenidos con el sistema de PCR en tiempo real común de aves concordaron con los obtenidos con los sistemas específicos de pollo y pavo, especies aviares presentes en la composición de los piensos industriales analizados. Al igual que en el sistema específico de pollo, se registraron valores de  $C_p$  variables en función del tipo de tejido analizado, evidenciando una menor degradación en el ADN procedente del tejido óseo comparado con el ADN de músculo, a una misma temperatura de procesado (133 °C). Asimismo, los resultados del análisis de las muestras sometidas a temperaturas más intensas (137, 141 y 145 °C durante 20 min a presión hiperbárica), reflejaron una disminución de la cantidad de ADN diana detectado a medida que aumentaba la intensidad del tratamiento térmico, limitando la sensibilidad de la técnica en aquellas muestras sometidas a temperaturas elevadas de procesado (muestras clasificadas como “no detectadas” en la Tabla 2, pág. 118). Así, el sistema común de aves permitió la detección de carcasa aviar a 137 y 141 °C (Tabla 2, muestras S17-S34), mientras que a la temperatura más elevada (145 °C) sólo la muestra S34, que contenía 100 % de diana, registró señal positiva de amplificación. Con relación al tejido muscular (Tabla 2, muestras S35-S50), la detección sólo fue posible en muestras de proteína aviar pura (100 %) (muestras S39, S45 y S50). Además de las muestras de piensos industriales positivas para aves, en este ensayo también se incluyeron varias muestras libres de material aviar en las que no se generó señal positiva de amplificación, demostrando la adecuada especificidad y selectividad de la técnica. Todas las muestras de pienso analizadas generaron señal positiva de amplificación con el sistema universal diseñado en el 18S ARNr (Tabla 2, pág. 118).

Los trabajos publicados hasta la fecha para la detección conjunta de varias especies de aves en piensos mediante PCR en tiempo real, son comparativamente más escasos que los enfocados a la detección específica e individual de especies como el pollo. Además, dichos trabajos están básicamente dirigidos a detectar el ADN de pollo y pavo (Dalmasso y col., 2004), o de pollo, pavo y oca (Yancy y col., 2009), sin tener en cuenta otras especies aviares. En este sentido, a pesar de que el pollo constituye la principal especie aviar en la elaboración de harinas cárnicas, es importante tener en cuenta que el término genérico de “aves de corral” (Reglamento CE 853/2004, DOUE de 25 de junio de 2004) también incluye otras especies como gallinas domésticas, pavos, pintadas, patos y ocas, que pueden ser procesadas junto con el pollo durante la fabricación de los piensos. Así, una de las ventajas de la metodología de PCR en tiempo real específica del grupo aviar con relación a otros trabajos es que su diseño se dirigió a la detección selectiva de una amplia representación de especies de la clase aviar susceptibles de incorporarse en la elaboración de piensos compuestos.

Los resultados obtenidos tras el análisis cuantitativo realizado tanto con los sistemas de PCR individuales como con el sistema común de aves, no permitieron estimar de forma precisa el contenido de harinas aviares en las muestras de piensos industriales analizadas. Al igual que en los ensayos anteriores, la intensidad del tratamiento térmico aplicado a la muestra y el tipo de tejido presente son las principales variables que influyen en la eficiencia de amplificación de las reacciones de PCR, limitando su aplicación a una detección cualitativa de la especie diana. A pesar de esta limitación, las técnicas desarrolladas para la detección específica de pollo, pavo, pato, oca y grupo aviar han demostrado su capacidad para detectar bajos porcentajes de tejido diana en los piensos, convirtiéndolos en protocolos útiles para facilitar la trazabilidad de los productos comercializados. Ante un posible levantamiento del veto a las harinas cárnicas en especies no rumiantes (*e.g.* cerdos y aves), las metodologías de PCR en tiempo real desarrolladas en esta parte del trabajo podrían constituir una herramienta complementaria al método microscópico oficial en el control de ingredientes animales en los piensos.

#### **IV.1.2.3. Especies de pescado**

La globalización de la industria pesquera ha impulsado la necesidad de desarrollar sistemas que permitan garantizar la trazabilidad de los productos de la pesca y la acuicultura en todas las fases de la cadena de producción, transformación y distribución (Rasmussen y Morrissey, 2008; Leal y col., 2015). Concretamente, la harina de pescado es una excelente fuente de proteínas fácilmente digestibles, y está permitida su inclusión como ingrediente en los piensos para animales de abasto como el cerdo, aves y crías de rumiantes, así como para animales de compañía (Zhou y col., 2011). El proceso de fabricación consiste en la molturación y desecación de pescados enteros, de partes de éstos o de residuos de la industria conservera, a los que se puede haber extraído parte del aceite. Los tratamientos normalmente empleados implican una cocción a 100 °C durante unos 20 minutos. No obstante, se han desarrollado procedimientos (harinas LT, *Low Temperature*) basados en la utilización de pescado entero fresco conservado y desecado a temperaturas más bajas (< 70 °C). Por lo tanto, el procesado térmico aplicado a los subproductos animales procedentes del pescado es menos agresivo que el empleado para las harinas de animales terrestres.

La demanda de piensos a base de harinas de pescado ha aumentado desde la publicación en 2008 del Reglamento CE 956/2008 (DOUE de 30 de septiembre de 2008), donde se permite, como excepción a la prohibición de alimentar a los rumiantes con proteínas de origen animal, la utilización de la harina de pescado en la alimentación de crías de rumiantes de granja no destetados como sustitutivo de la leche. Se mantiene, no obstante, el principio de no canibalismo, que prohíbe la alimentación de peces de piscifactoría con proteínas animales transformadas derivadas de peces de la misma especie (Reglamento CE 1069/2009, DOUE de 14 de noviembre de 2009). Por otra parte, en el contexto de la detección de proteínas animales en los piensos, la técnica oficial de análisis microscópico permite diferenciar los huesos de los animales terrestres de las

espinas de pescados en piensos. Sin embargo, la presencia de harinas de pescado en una muestra de pienso dificulta en gran medida la detección de las harinas de carne y huesos de mamíferos y aves, reduciendo la sensibilidad y especificidad del método microscópico (Veys y col., 2011; van Raamsdonk y col., 2012; Veys y Berben, 2013). Es por tanto necesario el empleo de métodos complementarios al análisis microscópico que permitan la detección e identificación específica de harinas de pescado en piensos. En este escenario, es importante resaltar que la legislación europea relativa al control del cumplimiento de las normas de la política pesquera común (Reglamento CE 1224/2009, DOUE de 22 de diciembre de 2009) hace referencia de forma explícita en su artículo 13 sobre “*nuevas tecnologías*” a la utilidad del empleo de análisis genéticos como una herramienta de trazabilidad. La modificación de dicho reglamento, publicada en el DOUE de 28 de diciembre de 2013 (Reglamento UE 1379/2013), incide de nuevo en este aspecto señalando textualmente que “*a efectos de la protección del consumidor, las autoridades competentes nacionales de los Estados miembros deben hacer pleno uso de la tecnología disponible, incluidas las pruebas de ADN, para disuadir a los operadores de falsear el etiquetado de las capturas*”. Asimismo, conviene mencionar que en los últimos años se han publicado dos nuevas normas ISO (*International Organization for Standardization*) que contemplan la utilización de marcadores moleculares para apoyar los sistemas de control de autenticidad y trazabilidad de los productos de la pesca (ISO, 2011a, b).

Considerando estos antecedentes, otro de los objetivos de esta Tesis Doctoral consistió en el empleo de una técnica de PCR en tiempo real para la detección de especies de pescado susceptibles de emplearse en la elaboración de harinas destinadas a la alimentación animal. En un trabajo previo de nuestro grupo (Martín y col., 2010) se desarrolló una técnica de PCR en tiempo real empleando una pareja de cebadores conservados diseñados en el gen 12S ARNr y el agente intercalador fluorescente SYBR<sup>®</sup> Green para la detección de 39 especies de pescado pertenecientes a las familias de peces de mayor interés comercial (Gádidos, Escómbridos, Salmónidos y Pleuronéctidos). Con el fin de mejorar la sensibilidad de dicha técnica, en este trabajo se diseñó una sonda de hidrólisis TaqMan<sup>®</sup> interna a la región delimitada por los cebadores conservados de pescado, que permitió reducir el límite de detección absoluto del ensayo desarrollado por Martín y col. (2010) de 10 pg a 0,1 pg de ADN de pescado.

La técnica de PCR en tiempo real con sonda TaqMan<sup>®</sup> específica de pescado se aplicó al análisis de una batería de piensos industriales elaborados por el EURL-AP (Bélgica), compuesta por siete muestras de referencia (R1-R7) y catorce de composición desconocida (B1-B14). Concluidos los análisis, los resultados obtenidos se contrastaron con los datos de composición real de los piensos, proporcionados posteriormente por el laboratorio de origen. Como muestra la Tabla 1 (pág. 129), el ensayo detectó la presencia de harinas de pescado a diferentes concentraciones (de 0,1 a 100 %) en todos los piensos que las contenían (con valores de  $C_p$  comprendidos entre  $14,55 \pm 0,05$  y  $24,90 \pm 0,05$ ) (Tabla 1, pág. 129). Además, se incluyeron en los análisis dos muestras

ciegas que resultaron no contener harinas de pescado (muestras B8 y B10) y en las que no se generó señal de amplificación, demostrando así la selectividad de la técnica.

Los resultados obtenidos en la cuantificación de las harinas de pescado en los piensos (muestras ciegas) empleando la recta de calibración elaborada a partir de las muestras de referencia, indicaron un grado de concordancia óptimo entre el contenido real de las harinas de pescado y el contenido estimado mediante la técnica de PCR (Tabla 1, pág. 129). Únicamente en el caso de un pienso (B7, 100 % harina de pescado), la cuantificación no fue posible ya que se trataba de una muestra cuya concentración se encontraba fuera del intervalo de linealidad de la recta de calibración del ensayo. Algunos trabajos publicados hacen referencia a las limitaciones asociadas a la cuantificación de harinas de pescado en piensos por técnicas de PCR en tiempo real (Martín y col., 2010; Benedetto y col., 2011; Prado y col., 2012, 2013). Todos concluyen que el tipo de tejido y la degradación del tejido diana como consecuencia de los tratamientos aplicados son los principales factores críticos en la evaluación de las medidas cuantitativas por PCR en tiempo real. En el presente trabajo, el laboratorio de origen no proporcionó la información relativa a los ingredientes y el tratamiento aplicado a las muestras de piensos industriales. No obstante, los resultados obtenidos en la cuantificación sugieren que las características de las muestras ciegas en términos de composición y tratamiento térmico eran homogéneas y similares a las de las harinas de referencia. Estas observaciones corroboran las conclusiones anteriores, en la medida en que una cuantificación exacta del ADN diana precisaría de la elaboración de diferentes rectas de calibrado a partir de materiales de referencia homogéneos y específicos para cada tipo de ensayo.

Como ya se ha señalado, otro factor determinante en el análisis cuantitativo mediante PCR en tiempo real es la selección de marcadores adecuados. La mayoría de técnicas de PCR en tiempo real aplicadas a la cuantificación de harinas de pescado en piensos emplean secuencias de ADN del genoma mitocondrial, debido a las ventajas que confiere frente a los marcadores nucleares (Martín y col., 2010; Benedetto y col., 2011). Benedetto y col. (2011) utilizaron una técnica de PCR en tiempo real para la detección y cuantificación de harinas de pescado en piensos, utilizando sondas TaqMan<sup>®</sup> MGB (*Minor Groove Binder*) y una pareja de cebadores diseñados en el gen mitocondrial 12S ARNr de dieciocho especies de pescados. El análisis de mezclas binarias que contenían distintos porcentajes (0,08-10 %) de harinas de pescado indicó la capacidad del ensayo para detectar hasta el porcentaje más bajo, y hasta 0,2 pg de ADN diana. No obstante, los resultados también pusieron de manifiesto que la aplicación del ensayo para la cuantificación de especies de pescado en piensos se encuentra limitada debido, entre otros factores, al número variable de mitocondrias presentes en los diferentes tejidos y, por tanto, de ADN mitocondrial amplificable (Fumière y col., 2009a; Martín y col., 2009c, 2010; Benedetto y col., 2011; López-Andreo, 2013). Como alternativa a los ensayos basados en marcadores mitocondriales, Prado y col. (2012) desarrollaron una técnica de PCR en tiempo real en el gen nuclear de la rodopsina, para detectar y cuantificar harinas de pescado en piensos. La técnica permitió la detección de veintidos

especies de pescado, si bien el límite de detección se evaluó únicamente con diluciones de ADN, situándose en 0,05 ng de ADN diana. A pesar de que el empleo de genes nucleares de copia única supera el inconveniente del diferente número de copias de los marcadores mitocondriales en función del tejido, la variabilidad observada en los resultados tampoco permitió una cuantificación precisa de las harinas de pescado (Prado y col., 2012).

Aún con las limitaciones descritas para la cuantificación, en este trabajo se seleccionaron marcadores basados en secuencias mitocondriales (gen 12S ARNr), ya que confieren a los ensayos de PCR una mayor sensibilidad comparada con la de los genes nucleares. Esto supone una importante ventaja a la hora de detectar la presencia de pequeños porcentajes (hasta 0,1 %) de harinas de pescado sometidas a los tratamientos térmicos aplicados en las fábricas de piensos. Los resultados obtenidos indicaron la capacidad de la técnica de PCR en tiempo real desarrollada para detectar de forma rápida, sensible y simultánea la presencia de las especies de pescado más frecuentemente empleadas en la elaboración de los piensos. Su utilización puede contribuir a garantizar el cumplimiento de la normativa comunitaria y tiene un gran interés para el control de autenticidad y trazabilidad de los productos derivados de la pesca destinados a la producción de piensos.

#### IV.1.2.4. Otras especies animales

Las Encefalopatías Espongiformes Transmisibles (EETs) pueden afectar de forma natural a muchos mamíferos, incluyendo ganado ovino, caprino y bovino, así como visones, ciervos y felinos (Imran y Mahmood, 2011). En el contexto de los programas de erradicación de la enfermedad, un trabajo reciente publicado por Chianini y col. (2012) ha puesto de manifiesto que los conejos, que se habían considerado como resistentes a las EETs durante más de cuatro décadas, también pueden contraer la enfermedad, si bien estos autores también sugieren que la aparición de una encefalopatía en esta especie es, a fecha de hoy, altamente improbable. En cualquier caso, el hecho de que los lepóridos o *Leporidae* (familia de mamíferos lagomorfos que engloba fundamentalmente especies de conejos y liebres) sean abundantes entre las poblaciones silvestres de todo el mundo y estén además vinculados con la producción de alimentos y piensos, hace imprescindible la adopción de una serie de medidas para prevenir una posible transmisión de la infección por priones, como evitar que estos animales ingieran harinas de carne y huesos de rumiantes o de su propia especie (Chianini y col., 2012). Teniendo en cuenta este escenario, se hace necesario el desarrollo de métodos analíticos sensibles y específicos para la detección de especies como el conejo y la liebre en los piensos.

Para abordar este objetivo, en este trabajo se desarrollaron tres sistemas de PCR en tiempo real, uno específico de conejo, otro de liebre y un tercer sistema común a estas dos especies (grupo lepórido), basados en el gen mitocondrial 12S ARNr. Debido a la falta de disponibilidad de muestras de piensos industriales que incluyeran material de las especies diana, cada sistema de PCR (conejo, liebre y grupo lepórido) se evaluó

mediante el análisis de mezclas binarias (músculo/avena) que contenían porcentajes crecientes desde 0,1 a 25 % del tejido diana correspondiente, tratado térmicamente a una temperatura de 133 °C. Los resultados obtenidos evidenciaron la capacidad de los ensayos para detectar hasta un 0,1 % de las especies objeto de estudio en las mezclas experimentales que reproducían las condiciones empleadas en la elaboración de los piensos. No obstante, a pesar de que los resultados de sensibilidad fueron óptimos, sería conveniente realizar análisis adicionales en piensos comerciales que contuvieran estas especies para verificar la aplicabilidad de la técnica en muestras reales.

La mayoría de las técnicas de PCR publicadas hasta el momento para el control de autenticidad de alimentos y piensos están enfocados a la identificación de ingredientes procedentes de especies de animales de abasto como la vaca y el grupo de los rumiantes y, en menor medida, cerdo, aves y pescados (Teletchea y col., 2005; Fajardo y col., 2010). Sin embargo, se presta mucha menos atención a la detección de especies de consumo menos frecuente como conejos y liebres (Santos y col., 2012). Dentro de los escasos ensayos de PCR disponibles para la detección específica de conejo en piensos, Bottero y col. (2003b) y Martín y col. (2009b) consiguieron detectar esta especie en tejidos tratados térmicamente a 121 °C durante 20 minutos. Ambos trabajos emplearon técnicas de PCR convencional, con las limitaciones que implican en términos de tiempo y laboriosidad en relación a los análisis por PCR en tiempo real. En cuanto a la detección de liebre, el número de estudios publicados hasta la fecha es aún más escaso. Entre ellos, Santos y col. (2012) desarrollaron una técnica de PCR en tiempo real para la identificación de carne de liebre, aunque el ensayo se limitó al análisis de tejidos crudos.

El caballo es otro mamífero cuya carne puede formar parte de la composición de alimentos y piensos. En este sentido, garantizar la protección frente al etiquetado fraudulento de productos procesados que puedan contener especies animales desconocidas, exóticas, o de menor interés comercial, es necesario por razones tanto económicas como de salud pública (Meyer y Candrian, 1996). En enero de 2013, la Agencia Irlandesa de Seguridad Alimentaria (FSAI, *Food Safety Authority of Ireland*) reveló la presencia de trazas de ADN procedente de carne de caballo no declarada en hamburguesas de vacuno, que se atribuyó a una posible contaminación cruzada accidental en las líneas de procesado (O'Mahony, 2013). Sin embargo, en los meses posteriores, la FSAI anunciaba la detección de concentraciones elevadas (hasta el 100 % en algunos casos) de carne de caballo en varias hamburguesas y platos preparados etiquetados como carne de vacuno. Por ello, la Comisión Europea llevó a cabo un plan coordinado de control en los Estados Miembros dirigido a establecer la prevalencia de prácticas fraudulentas en la comercialización de determinados alimentos (Recomendación UE 99/2013, DOUE de 21 de febrero de 2013). Los resultados de dicho plan evidenciaron la existencia de un 5 % de productos alimenticios incorrectamente etiquetados, y confirmaron la existencia de una amplia red de fraude que comercializaba carne de caballo como carne de vacuno (Comisión Europea, 2013). Aunque no se encuentra directamente vinculado a un riesgo para la salud humana, la enorme trascendencia mediática del llamado "escándalo de carne de caballo" ha mermado la

confianza de los consumidores en la seguridad alimentaria y constituye otro ejemplo de práctica ilícita de sustitución de especies animales no declaradas en el etiquetado, que es necesario controlar y prevenir (Cawthorn y col., 2013). Teniendo en cuenta esta alerta de fraude, en esta Tesis Doctoral se decidió abordar el diseño de un sistema de PCR en tiempo real específico de caballo en la región mitocondrial 12S ARNr para detectar esta especie y verificar el etiquetado de diferentes productos comerciales. Paralelamente, la Comisión Europea aprobaba una segunda ronda de controles en el comercio al por menor y en otros establecimientos alimentarios, y el Laboratorio Comunitario de Referencia para las Proteínas Animales en los piensos (EURL-AP) desarrollaba y publicaba en su sitio web (<http://eurl.craw.eu/>) un protocolo armonizado basado en una técnica de PCR en tiempo real para detectar la presencia de carne de caballo no declarada en alimentos (Recomendación UE 180/2014, DOUE de 29 de marzo de 2014). Aunque la Comisión establece dicha técnica como el método de referencia para comprobar la presencia de ingredientes equinos en elaborados cárnicos, no excluye el empleo complementario de otros sistemas de PCR para mejorar la detección de dichos componentes.

El sistema de PCR en tiempo real específico de caballo desarrollado en este trabajo se empleó en el análisis de 81 muestras de diferentes productos cárnicos comerciales, de las cuales treinta declaraban caballo y el resto no incluían esta especie entre sus ingredientes (Tabla 3, pág. 153). Como muestra la Tabla 3, el ensayo detectó la presencia de caballo en todos los productos comerciales que declaraban esta especie, mientras que en el resto de muestras analizadas (que contenían otros ingredientes como vaca, pollo, cerdo, *etc.*) no se registró señal positiva de amplificación, mostrando una total consonancia de los resultados con la información declarada en el etiquetado. Los resultados obtenidos podrían indicar una mejora en el cumplimiento de la normativa de trazabilidad como consecuencia de las medidas de control implementadas en la Unión Europea tras el escándalo de la carne de caballo (Recomendación UE 99/2013, DOUE de 21 de febrero de 2013). En consonancia con estas observaciones, en un estudio reciente publicado por Cawthorn y col. (2013) no se detectó la presencia de ADN de caballo en una batería de productos cárnicos comerciales en los que no se declaraba esta especie, al emplear una técnica de microarrays de ADN basada en el kit comercial *Meat Species 1.6 LCD Array* (Chipron GmbH, Berlín, Alemania). No obstante, este estudio reveló la presencia de ADN procedente de otras especies animales que no aparecían reflejadas en el etiquetado de los productos analizados (Cawthorn y col., 2013).

La mayoría de los trabajos publicados hasta el momento para la detección de ADN de caballo en productos cárnicos emplean el análisis del polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción de regiones amplificadas por PCR (PCR-RFLP) (Meyer y col., 1995; Fairbrother y col., 1998; Partis y col., 2000; Santaclara y col., 2007; Doosti y col., 2014). No obstante, la técnica de PCR-RFLP puede resultar inadecuada para la identificación de especies en alimentos procesados en los que el ADN está fragmentado, y también se encuentra limitada en el análisis de mezclas que incluyan dos o más especies en su composición (Girish y col., 2004; Jonker y col., 2008; Martín y col.,

2009a). Los métodos de PCR con cebadores especie-específicos superan estas limitaciones, ya que permiten la amplificación de fragmentos de ADN pequeños a partir de matrices que contienen un *pool* de secuencias de diferentes especies. La mayoría de ensayos de PCR que abordan la detección específica de caballo en alimentos procesados emplean el protocolo de amplificación convencional (Matsunaga y col., 1999; Ilhak y Arslan, 2007; Xu y col., 2008; Martín y col., 2009a; Kesmen y col., 2010). Sin embargo, y a pesar de las ventajas que ofrece la técnica de PCR en tiempo real frente a la PCR clásica, son escasos los trabajos publicados hasta el momento para la detección específica de caballo mediante esta metodología (Chisholm y col., 2005; Tanabe y col., 2007; Jonker y col., 2008; Köppel y col., 2011). Köppel y col. (2011) emplearon el gen nuclear que codifica el receptor de la hormona del crecimiento (GHR, *Growth Hormone Receptor*) para detectar ADN de caballo en productos cárnicos mediante una técnica de PCR en tiempo real. Los resultados obtenidos indicaron la existencia de reacciones cruzadas del sistema de PCR de caballo con especies filogenéticamente próximas como el burro.

Puede concluirse que la técnica de PCR en tiempo real específica de caballo desarrollada en esta parte del trabajo permitió la detección específica y sensible de esta especie en una amplia selección de productos cárnicos comerciales, resultando de gran utilidad para el control de la autenticidad y trazabilidad de alimentos y piensos.

#### **IV.1.2.5. Análisis de alimentos para animales de compañía**

El creciente aumento en el número de mascotas, así como de la atención y cuidados que se les presta, indican el gran potencial de la industria de piensos para animales de compañía. Desde el año 2009, el Reglamento CE 767/2009 sobre la comercialización y la utilización de los piensos (DOUE de 1 de septiembre de 2009) ha hecho extensibles los principios de seguridad alimentaria y trazabilidad a los piensos destinados a la alimentación de animales no productores de alimentos (*i.e.* mascotas), con el fin de garantizar la aplicación integral y coherente de estos principios en todo el sector de la alimentación animal. El Reglamento CE 767/2009 indica de forma explícita que “*el etiquetado debe proporcionar a los compradores la información necesaria que les permita elegir de la mejor manera en función de sus necesidades, y debe ser consistente, coherente, transparente y comprensible*”. Asimismo, establece que las materias primas deben aparecer por su nombre específico o categoría en el etiquetado de los piensos compuestos para animales de compañía. Desarrollar un etiquetado comunitario armonizado y competitivo era preciso en este sector ya que, hasta la publicación del Reglamento CE 767/2009, los fabricantes de alimentos para mascotas frecuentemente tenían que elaborar y seguir directrices internas de su empresa relativas al etiquetado. En este contexto, dicho reglamento aprobó la elaboración de un Código Comunitario de Buenas Prácticas de Etiquetado de Alimentos para Animales de Compañía, en el que se ofrece una orientación clara sobre cómo deben aplicarse las disposiciones de la legislación vigente respecto a la información proporcionada a los compradores sobre los productos alimenticios para mascotas y sus características (FEDIAF, 2011). Por ello, y



para garantizar una aplicación uniforme de la legislación en toda la cadena de producción y comercialización de piensos, es imprescindible el desarrollo de métodos analíticos que permitan la detección de todas las especies presentes en esta categoría de productos (Reglamento CE 767/2009, DOUE de 1 de septiembre de 2009). Teniendo en cuenta estos aspectos, en esta Tesis Doctoral se evaluó la aplicabilidad de las técnicas de PCR en tiempo real desarrolladas al control de autenticidad de piensos para mascotas, incluyendo una amplia gama de productos comerciales de diferentes características y composición (comida seca y enlatada, *pâtés*, aperitivos, gelatinas y *snacks*).

Las materias primas procedentes de las aves, y en especial del pollo, son ingredientes frecuentemente empleados en la formulación de piensos para perros y gatos, ya que constituyen una excelente fuente de proteínas. En este sentido, los fabricantes de estos alimentos pueden declarar la presencia de proteínas aviares en el etiquetado de sus productos, pero no existe una garantía de que estos componentes se sustituyan de forma fraudulenta por otras fuentes proteicas de calidad cuestionable, lo que podría originar pérdidas económicas y afectar a la salud de las mascotas. Asimismo, la presencia no declarada de ingredientes aviares en los alimentos puede suponer un peligro sanitario, ya que ciertas proteínas animales pueden causar reacciones adversas en individuos sensibles (Hefle y col., 2001; Turnbull y col., 2015).

Teniendo en cuenta estas premisas, la técnica de PCR en tiempo real específica del grupo de las aves se aplicó al análisis de un total de 210 productos comerciales destinados a la alimentación de perros y gatos, formulados como comida seca, semi-húmeda y enlatada, dependiendo del tipo de procesado empleado por cada fabricante (Tabla 3, pág. 119-120). Como se observa en la tabla, 123 de las 210 muestras contenían diferentes ingredientes (harinas, carne, grasa, vísceras y músculo), etiquetados en unos casos bajo la denominación genérica de “aves de corral” y, en otros, con la especie aviar concreta (pollo, pavo, codorniz, faisán, pato y avestruz). El resto de los productos (87) no declaraba la presencia de ningún ingrediente aviar en su composición. El empleo del sistema de PCR en tiempo real permitió la detección del ADN diana en todas las muestras que declaraban contener aves en concentraciones del 5 al 100 %, así como en algunas donde no se especificaba el porcentaje aviar presente (muestras representadas como “NS” en la Tabla 3). De los 87 productos (libres de ingredientes aviares), únicamente el 24,1 % mostraron concordancia con el etiquetado, ya que no se detectó la presencia de ADN diana tras su análisis en el ensayo de PCR en tiempo real. Sin embargo, casi la mitad de estas muestras (42) registraron señales positivas de amplificación (con valores de  $C_p$  comprendidos entre  $14,78 \pm 0,02$  y  $25,75 \pm 0,20$ ), revelando un fraude comercial por la presencia no declarada de material aviar. En las veinticuatro muestras restantes (27,6 %) se obtuvieron valores de  $C_p$  tardíos ( $> 30$ ), lo cual podría sugerir una contaminación cruzada inadvertida en algún punto de la elaboración en la planta procesadora. La contaminación cruzada representa un problema en las plantas transformadoras de alimentos y piensos, ya que no es infrecuente que pequeños restos de materias primas permanezcan adheridos a las

superficies, y provoquen su transferencia a los lotes de fabricación posteriores (Gizzi y col., 2003a; Dalmaso y col., 2004; Ioja-Boldura y col., 2011; Cawthorn y col., 2013).

La harina y el aceite de pescado son también componentes habituales de los piensos para animales de compañía. Estos ingredientes constituyen una excelente fuente de proteínas y ácidos grasos omega 3, y se caracterizan por su elevada digestibilidad y palatabilidad (Zhou y col., 2011). En este contexto, los elevados precios de los derivados de pescado, resultantes de la creciente demanda por la industria productora de piensos, convierte a este sector en un mercado vulnerable de sufrir prácticas fraudulentas que pueden afectar a la autenticidad y seguridad de sus productos (de Silva y Turchini, 2008). Además del fraude económico, la presencia no declarada de pescado en los alimentos para mascotas puede plantear un riesgo sanitario, ya que las proteínas de estas especies se incluyen entre los grupos de ingredientes más susceptibles de causar reacciones adversas en animales sensibles (Wild y Lehrer, 2005).

La técnica de PCR en tiempo real específica de pescado desarrollada en este trabajo se aplicó al análisis de cien muestras de piensos comerciales para mascotas que contenían diferentes subproductos y derivados de pescado (harina, músculo y aceite). Como se observa en la Tabla 2 (pág. 130), el ensayo permitió la detección del ADN diana en la mayoría de las muestras analizadas (96 %), de acuerdo con la información suministrada en el etiquetado. El contenido de pescado detectado varió del 0,2 al 40,1 %, detectándose también algunos productos de porcentaje no especificado (muestras representadas como “NS” en la Tabla 2). Las muestras que presentaron resultados discrepantes fueron la F93 y F96, que declaraban contener un pequeño porcentaje de aceite de pescado (0,2 %), pero no generaron señal de amplificación con el sistema de PCR. Estos resultados pueden atribuirse, bien a la ausencia de aceite de pescado en estas muestras, lo que sugeriría un posible fraude de etiquetado, o a una menor cantidad y/o calidad del ADN presente en la matriz de aceite de pescado en comparación con el de las harinas, como consecuencia de los tratamientos de transformación aplicados a la materia prima para separar las grasas de los sólidos y el agua. Esta última observación se hace particularmente evidente en las muestras que contienen un bajo contenido (0,2 %) de diana, y está en consonancia con otros trabajos que describen dificultades en la amplificación por PCR a partir de matrices grasas de diversos orígenes (Costa y col., 2012). En la misma línea, se registraron valores de  $C_p$  tardíos ( $> 35$ ) en las muestras F97 a F100, cuyas etiquetas declaraban una baja concentración (0,2 %) de aceite de pescado, evidenciando la particular dificultad de esta matriz lipídica para su amplificación por PCR. Estos resultados subrayan la importancia de la elección de métodos adecuados de purificación de ADN libre de inhibidores, así como del diseño de ensayos de PCR basados en la amplificación de fragmentos de ADN de pequeño tamaño. Por otra parte, las muestras F81 a F92, que declaraban aceite de pescado en porcentajes no especificados (representadas como “NS” en la Tabla 2), se detectaron con éxito y sugieren la presencia de un mayor contenido de este ingrediente en las mismas.

Además de las aves y el pescado, en los últimos años han surgido en el mercado numerosas preparaciones para perros y gatos que incluyen entre sus componentes carne de especies novedosas o de consumo menos frecuente como el conejo, la liebre y el caballo. Estas carnes son muy apreciadas por sus propiedades dietéticas (son magras y tienen menor contenido de grasa, ácidos grasos saturados y colesterol que otras carnes), y están ganando cada vez más popularidad como ingredientes en piensos *gourmet* y en fórmulas destinadas a la alimentación de animales que sufren algún tipo de alergia alimentaria (Peiretti, 2012; Santos y col., 2012). Por lo tanto, se hace necesario el desarrollo de técnicas analíticas que permitan identificar también estas especies en los piensos animales.

La aplicabilidad de los sistemas de PCR en tiempo real específicos de conejo, liebre y grupo lepórido (conejo y liebre) se evaluó mediante el análisis de 96 alimentos comerciales para perros y gatos (comida enlatada y seca, *pâté*, aperitivos, y gelatinas), que declaraban contener, entre otras especies, ingredientes procedentes de conejo en su composición. Como muestra la Tabla 3 (pág. 145), el sistema específico de conejo detectó la presencia de esta especie en 80 de las 96 (83,3 %) muestras analizadas, en consonancia con la información del etiquetado. El contenido de conejo detectado varió del 1 al 50 %. Asimismo, en algunas muestras no se especificaba el porcentaje de conejo presente (muestras representadas como “NS” en la Tabla 3). De igual forma, el sistema común de lepóridos registró resultados similares a los obtenidos con el sistema específico de conejo, corroborando los resultados del ensayo anterior. El 16,7 % de las muestras (Cn1–Cn8 y Cn89–Cn96, que declaraban contener de un 5 a un 100 % de carne de conejo) no generaron señal de amplificación con ninguno de los dos sistemas de PCR empleados (conejo y grupo lepórido), sugiriendo una posible falsificación y etiquetado engañoso de estos piensos. En el caso del sistema de PCR en tiempo real específico de liebre, ninguna de las muestras comerciales registró señal positiva de fluorescencia, de acuerdo con la ausencia de esta especie en su etiquetado. A pesar de que no se encontraron en el mercado alimentos para mascotas con ingredientes a base de liebre, hay que tener en cuenta que el ensayo de PCR detectó de forma sensible las correspondientes mezclas binarias tratadas a 133 °C (Figura 2, pág. 144), evidenciando el potencial de la técnica para detectar niveles bajos de material procedente de esta especie en alimentos y piensos sometidos a un procesamiento intenso.

Con relación al caballo, se analizaron un total de noventa productos comerciales para mascotas (comida seca y enlatada, *pâté*, aperitivos, y gelatinas). En la Tabla 4 (pág. 154) se observa cómo el sistema de PCR específico de caballo detectó satisfactoriamente las 33 muestras cuyo etiquetado incluía ingredientes equinos, con valores de  $C_p$  de 16 a 20. Los resultados obtenidos en los 57 piensos que no declaraban caballo en su composición evidenciaron que la mayoría (79 %) no generó señal de amplificación en la PCR, de acuerdo con el etiquetado. Sin embargo, en el resto de estas muestras supuestamente negativas, se registraron valores de  $C_p$  superiores a 30, sugiriendo una posible contaminación cruzada en las líneas de procesamiento en la elaboración de los piensos.

Con el fin de completar el control de autenticidad de los piensos para animales de compañía, los productos comerciales analizados con los ensayos de PCR en tiempo real descritos para la detección de aves, pescados, conejo, liebre y caballo, se analizaron también mediante los sistemas específicos de vaca, oveja, cerdo, pollo, pavo, aves y pescado desarrollados en esta Tesis, así como con una pareja de cebadores específicos de ciervo diseñada previamente por nuestro grupo (Fajardo y col., 2008). En la mayoría de los productos analizados, las especies detectadas mediante estos análisis coincidieron con las especies declaradas en su lista de ingredientes, a excepción de las muestras Cn1–Cn8 y Cn89–Cn96 (Tabla 3, pág. 145). En estas muestras, etiquetadas como “carne de conejo”, no se detectó la presencia de ADN de conejo, pero sí de otras especies animales como el cerdo y el pollo, sugiriendo un posible fraude intencionado de sustitución derivado del empleo de carnes más baratas (cerdo y pollo) en la elaboración del producto.

Hay que señalar que la gran variedad de ingredientes que se emplean en la preparación de los alimentos para mascotas (carne, vísceras, grasa, leche, huevos, vegetales, *etc.*), así como los diferentes tratamientos térmicos aplicados en las industrias que los elaboran, no permitieron establecer una relación cuantitativa entre el contenido real de las especies diana y el estimado mediante los ensayos de PCR. No obstante, aunque sólo se empleasen con fines cualitativos, las técnicas de PCR desarrolladas en esta Tesis Doctoral constituyen una herramienta útil para determinar el origen animal de piensos para mascotas, incluso si los productos han sido sometidos a tratamientos térmicos intensos o presentan en su composición diversos ingredientes mezclados con bajos porcentajes de la especie diana.

Durante la última década, han sido numerosos los estudios publicados sobre aplicación de metodologías de PCR y PCR en tiempo real para el control de autenticidad en piensos destinados a la alimentación del ganado (Fumière y col., 2006, 2010b, 2012a, b, 2013, 2014; Prado y col., 2007, 2009, 2012, 2013; Martín y col., 2008, 2009c, 2010; Tavoletti y col., 2009; Myers y col., 2010; Benedetto y col., 2011; Casazza y col., 2011; Ekins y col., 2012; von Holst y col., 2012; Safdar y Junejo, 2015b). Sin embargo, son comparativamente mucho más escasos los trabajos que aplican esta metodología a la detección de especies en piensos para animales de compañía (Dalmasso y col., 2004; Myers y col., 2004; Wang y col., 2004; Cawthraw y col., 2009; Rojas y col., 2011). Además, por lo general sólo analizan un reducido número de muestras con una representación de productos muy limitada y la mayoría emplean técnicas de PCR convencional, con las limitaciones que conllevan en comparación con los ensayos de PCR en tiempo real. Dalmasso y col. (2004) desarrollaron una técnica de PCR múltiple convencional para detectar el ADN de rumiantes, aves, pescado y cerdo en piensos animales, incluyendo cuatro muestras comerciales destinadas a la alimentación de mascotas. Para ello, diseñaron cebadores específicos que amplificaban fragmentos comprendidos entre 104 y 290 pb de los genes mitocondriales 12S ARNr y 16S ARNr. Los resultados obtenidos revelaron una total consonancia con la información declarada en el etiquetado de los productos, a excepción de una muestra, en la que se detectó la

presencia no declarada de material aviar en su composición. Myers y col. (2004) emplearon parejas de cebadores en una técnica de PCR convencional para la detección específica de perro, gato, caballo, vaca, cerdo, oveja y aves en 31 muestras de piensos para perro. Los resultados de este estudio revelaron la presencia de ingredientes animales en 27 de las 31 muestras analizadas, de acuerdo con el etiquetado de las mismas, mientras que no se detectó ADN de ninguna de las especies diana en las cuatro muestras restantes. Wang y col. (2004) realizaron un estudio de mercado para detectar la presencia de varias especies animales (vaca, cabra, cerdo y pollo) en piensos comerciales para perro y gato, empleando la técnica de PCR-RFLP en un fragmento de 359 pb del gen citocromo b. Los resultados obtenidos utilizando las enzimas de restricción *Alu I* y *Mbo I* demostraron que los piensos para perro contenían carne de vaca, cabra, cerdo, y pollo, mientras que los piensos para gato contenían carne de pollo, de acuerdo en ambos casos con la información suministrada en la lista de ingredientes. Cawthraw y col. (2009) desarrollaron una técnica de PCR en tiempo real en el gen mitocondrial 16S ARNr para detectar harinas de carne y huesos de mamíferos (vaca, oveja y cerdo) y de aves en piensos para animales de abasto y de compañía. La técnica se aplicó con éxito al análisis de 56 muestras de productos comerciales destinados a la alimentación de mascotas (conejo, perro y gato) que declaraban contener ingredientes procedentes de una o varias especies animales en su composición. Ioja-Boldura y col. (2011) emplearon la técnica de PCR convencional con cebadores específicos de rumiantes, aves, cerdo y pescado descrita por Dalmaso y col. (2004) en el análisis de alimentos para animales de compañía. Los sistemas específicos detectaron la presencia de las correspondientes especies diana en las muestras analizadas, en consonancia con la declaración de sus componentes. No obstante, también se detectó ADN de cerdo en muestras que no declaraban esta especie en su composición. Rojas y col. (2011) desarrollaron una técnica de PCR convencional para la detección específica de codorniz, faisán y avestruz en productos comerciales para perros y gatos. El empleo de cebadores especie-específicos diseñados en el gen 12S ARNr permitió la detección sensible de las especies diana en los productos analizados. No obstante, en doce de los piensos para perro etiquetados como “carne de faisán” no se detectó la presencia de esta especie, lo cual podría indicar un fraude en el etiquetado de los piensos.

Teniendo en cuenta los resultados alcanzados en esta Tesis Doctoral, se puede concluir que las metodologías de PCR en tiempo real propuestas, que emplean sistemas de cebadores/sondas TaqMan<sup>®</sup> específicos de especie (vaca, oveja, cabra, cerdo, pollo, pavo, pato, oca, conejo, liebre y caballo), y de grupos de especies (rumiantes, aves, pescados y lepóridos), constituyen herramientas rápidas, sensibles y fiables que pueden contribuir a garantizar el cumplimiento de las normas de la Unión Europea y evitar prácticas fraudulentas en la elaboración de los piensos.

#### IV.2. IDENTIFICACIÓN DE MARCADORES EPIGENÉTICOS DE METILACIÓN DEL ADN ESPECÍFICOS DE TEJIDO PARA LA DIFERENCIACIÓN DE INGREDIENTES ANIMALES EN PIENSOS

Las técnicas de PCR en tiempo real desarrolladas en esta Tesis Doctoral han permitido la detección específica y sensible de ADN procedente de diferentes especies de mamíferos, aves y pescados en piensos. No obstante, a pesar de las ventajas que ofrece la metodología de PCR en tiempo real en este campo, una de sus limitaciones está relacionada con la detección de ingredientes autorizados (e.g. productos lácteos o grasas) en los piensos para la alimentación del ganado, componentes que también pueden constituir una fuente de ADN animal. La presencia de estos ingredientes en los piensos puede dar lugar, por tanto, a resultados falsos positivos desde una perspectiva legal, aunque no reflejarían un incumplimiento de la prohibición relativa a los piensos (Bellorini y col., 2005; Prado y col., 2007; Fumière y col., 2010b). Esta limitación plantea la necesidad de desarrollar métodos analíticos complementarios a las técnicas de PCR en tiempo real, basados en marcadores que permitan identificar y diferenciar el ADN procedente de material animal prohibido de aquel procedente de ingredientes autorizados en la elaboración de los piensos.

Recientemente, los marcadores epigenéticos basados en la metilación del ADN se han aplicado con éxito para la diferenciación de tejidos en distintas áreas de investigación como el control de autenticidad de alimentos (Gout y col., 2004) y la medicina forense (Frumkin y col., 2011; Madi y col., 2012; Vidaki y col., 2013; Wasserstrom y col., 2013). El término *epigenética* (del griego *epi*, en o sobre, y *-genética*) fue acuñado por primera vez en la década de los cincuenta para describir las interacciones causales entre los genes y sus productos, de las cuales resulta el fenotipo (Waddington, 1952). En la actualidad se conoce que este proceso se logra mediante marcas moleculares detectables que generan modificaciones que afectan a la actividad transcripcional de los genes y que, una vez establecidas, son relativamente estables en las siguientes generaciones (Morgan y Whitelaw, 2008). Por lo tanto, la *epigenética* puede definirse como el estudio de los cambios heredables en la expresión génica sin modificaciones en la secuencia de bases del ADN (Russo y col., 1996). Algunas de las marcas epigenéticas más reconocidas son la metilación del ADN y las modificaciones químicas de las histonas, proteínas alrededor de las cuales se enrolla el ADN (García y col., 2012).

La metilación del ADN tiene funciones esenciales en el control de la transcripción de los genes, así como en el mantenimiento de la estabilidad del genoma. En mamíferos, la forma de metilación del ADN más frecuente consiste en la unión covalente de un grupo metilo al quinto carbono de las citosinas (C) seguidas de guaninas (G) (i.e. dinucleótidos CpG, donde la "p" representa el enlace fosfato entre ambos nucleótidos). Los dinucleótidos CpG tienden a concentrarse en los promotores génicos, configurando las llamadas islas CpG (Illingworth y Bird, 2009). Las islas CpG no suelen estar metiladas en células normales, permitiendo la expresión del gen cuando los factores de transcripción

correspondientes están disponibles. Por el contrario, la metilación de la región promotora de un gen provoca el silenciamiento transcripcional del mismo, al impedir la accesibilidad de la secuencia del ADN a los factores que finalmente regulan la expresión génica (Deaton y Bird, 2011). Independientemente del mecanismo por el cual la metilación del ADN afecta a la expresión de los genes, del que aún se conoce poco, se ha demostrado la existencia de islas CpG que presentan regiones diferencialmente metiladas (DMRs, *Differentially Methylated Regions*) específicas de tejido (Song y col., 2005; Eckhardt y col., 2006; Frumkin y col., 2011; Hirabayashi y col., 2013). En este sentido, Eckhardt y col. (2006) describieron la existencia de islas CpG que están metiladas de forma diferencial en determinados tejidos humanos de manera estable y específica, convirtiéndolos en excelentes marcadores para la identificación del tipo de tejido (Madi y col., 2012).

Teniendo en cuenta estas consideraciones, esta parte del trabajo de investigación, realizado durante la estancia predoctoral en el Laboratorio Comunitario de Referencia para las Proteínas Animales en los piensos (EURL-AP, *European Union Reference Laboratory for Animal Proteins in feedingstuffs*, CRA-W, *Centre Wallon de Recherches Agronomiques*, Gembloux, Bélgica), se enmarcó en un proyecto enfocado a evaluar el potencial de marcadores epigenéticos basados en la metilación del ADN para la identificación y diferenciación de tejidos procedentes de ingredientes autorizados y prohibidos en los piensos destinados a animales de abasto. Concretamente, en este trabajo se seleccionó la región promotora del gen que codifica la proteína ácida fibrilar glial (GFAP, *Glial Fibrillary Acidic Protein*) del genoma bovino para llevar a cabo la diferenciación entre tejido nervioso (cerebro y médula espinal) y otros tejidos no neuronales (músculo, hígado, corazón y leche) mediante una metodología de modificación del ADN con bisulfito y pirosecuenciación.

Condorelli y col. (1994, 1997) y Teter y col. (1994a, b) estudiaron el papel de la metilación del ADN en la regulación del gen que codifica para la proteína ácida fibrilar glial (GFAP), constituyente de los filamentos intermedios del citoesqueleto de los astrocitos del sistema nervioso central. Para ello, estos autores analizaron el estado de metilación de varias citosinas individuales en la región promotora del gen GFAP en varios tejidos de rata, evidenciando la existencia de una región situada en su extremo 5' que presentaba un patrón de metilación del ADN específico de tejido nervioso en esta especie. En particular, observaron una disminución de los niveles de metilación (hipometilación) en siete dinucleótidos CpG comprendidos a lo largo de la secuencia diana (Figura 1, pág. 169).

Con el fin de estudiar la región de interés en el genoma bovino, se seleccionaron las secuencias disponibles de los promotores del gen GFAP de vaca (Gout y col., 2004) y rata (Condorelli y col., 1994). El alineamiento y análisis informático de dichas secuencias permitió la identificación de ocho dinucleótidos CpG en la secuencia bovina (Figura 1, pág. 169). Una vez seleccionada la región de interés, se procedió al diseño de una pareja de cebadores para la amplificación de un fragmento de 139 pb en la región

promotora del gen GFAP bovino, que contenía cuatro de los ocho dinucleótidos CpG previamente identificados (dos de los cuales eran comunes con la rata). Uno de los cebadores se marcó con una molécula de biotina para su posterior inmovilización durante las reacciones de pirosecuenciación. Asimismo, se diseñó un cebador de secuenciación que hibrida específicamente en una secuencia diana del producto de PCR, permitiendo el posterior análisis del estado de metilación del fragmento de interés. La Tabla 1 (pág. 170) incluye las secuencias nucleotídicas correspondientes a los tres oligonucleótidos empleados en este trabajo.

Las reacciones de amplificación por PCR se llevaron a cabo por triplicado a partir del ADN modificado con bisulfito de muestras procedentes de diferentes tejidos crudos de vaca (cerebro, médula espinal, músculo, hígado, corazón y leche). La pareja de cebadores diseñados en este trabajo permitió la amplificación del fragmento esperado a partir del ADN modificado de todos los tejidos analizados (Figura 2, pág. 171). Posteriormente, se llevaron a cabo las reacciones de pirosecuenciación empleando el cebador de secuenciación, y los datos obtenidos se analizaron con el software *PyroMark® Q24 Assay* (QIAGEN GmbH, Hilden, Alemania), que permitió el estudio cuantitativo del estado de metilación correspondiente a cada uno de las cuatro posiciones CpG analizadas para las muestras de músculo, médula espinal y cerebro. El Pirograma® de la Figura 3 (pág. 172) muestra los perfiles y porcentajes de metilación de la secuencia diana, obtenidos a partir de muestras de tejidos bovinos procedentes de músculo (Figura 3A), médula espinal (Figura 3B), y cerebro (Figura 3C). Asimismo, la Tabla 2 (pág. 173) recoge los porcentajes de metilación de los cuatro dinucleótidos CpG estudiados, para los triplicados de músculo, médula espinal y cerebro. Estos resultados revelaron la existencia de una región situada en el extremo 5' del gen GFAP con un perfil de metilación del ADN (hipometilación) específico de tejido nervioso de vaca, permitiendo la diferenciación entre las muestras de este tipo de tejido (cerebro y médula espinal) y del resto de tejidos no neuronales analizados (músculo, hígado, corazón y leche). Como se observa en la Tabla 2 (pág. 173), la media de los porcentajes de metilación obtenidos para el tejido muscular en las posiciones CpG 2 y 3 fue del 94,3 y 99 %, respectivamente. Esta tendencia fue similar en otros tejidos no neuronales analizados como el hígado, corazón y leche (resultados no mostrados). Sin embargo, en el caso del tejido nervioso (médula espinal y cerebro) los valores de metilación se sitúan en torno al 50 %. Con relación a los resultados obtenidos en la primera y cuarta posición, aunque los niveles de metilación no se podrían considerar como hipermetilados (> 80 %) en músculo, estos porcentajes siguen siendo en torno al doble de los registrados en el tejido neuronal en estas mismas posiciones (Tabla 2). Estos resultados están en consonancia con los trabajos publicados por Condorelli y col. (1994, 1997) y Teter y col. (1994a, b), en los que se describe una región diferencialmente metilada específica de tejido nervioso en el promotor del gen GFAP de rata, y concuerdan con las observaciones de otros autores que sugieren que la metilación del ADN es un proceso conservado entre los mamíferos (Eckhardt y col., 2006). Una vez comprobado el potencial de la metodología desarrollada para la diferenciación de tejidos



de vaca crudos, se procedió a evaluar su aplicabilidad para el análisis de tejidos tratados térmicamente, con el fin de demostrar su idoneidad en la identificación de ingredientes animales en matrices procesadas como los piensos. La influencia del tratamiento térmico sobre la metilación del ADN se evaluó mediante el análisis de muestras procedentes de diferentes tejidos bovinos (músculo, cerebro y médula espinal) tratados a 121 °C durante 20 minutos. Como muestra la Figura 4 (pág. 174), la pareja de cebadores diseñados en este trabajo permitió la amplificación del fragmento de ADN esperado de 139 pb a partir de todas las muestras analizadas. No obstante, los resultados de las reacciones posteriores de pirosecuenciación no permitieron establecer un patrón de metilación reproducible y específico de tejido. Así, mientras que los valores de metilación registrados en las muestras de cerebro crudas y tratadas térmicamente fueron similares, el análisis del tejido muscular tratado térmicamente reveló una disminución general de los niveles de metilación en comparación con los porcentajes obtenidos para el tejido muscular crudo (resultados no mostrados). Estos resultados sugieren que aunque el ADN es una molécula estable, los tratamientos térmicos podrían afectar de forma variable a la cantidad y calidad del ADN diana amplificable dependiendo del tipo de tejido de que se trate (Fumière y col., 2009a; Pegels y col., 2012a, b). Si bien cabría esperar que la metilación de las citosinas, establecida mediante una unión covalente estable, permitiera la preservación de esta marca epigenética en los tejidos tratados térmicamente, los resultados obtenidos en esta parte del trabajo no fueron concluyentes, siendo necesario un mayor número de ensayos para determinar la influencia de los tratamientos térmicos sobre la metilación del ADN en los distintos tejidos de interés.

Se puede concluir que el trabajo desarrollado durante la estancia predoctoral en el EURL-AP (Bélgica), basado en el empleo de marcadores epigenéticos de metilación del ADN específicos de tejido, ha permitido la diferenciación específica de tejido nervioso bovino del resto de tejidos no neuronales analizados. Sin embargo, la aplicabilidad de la técnica para diferenciar el origen tisular de ingredientes bovinos presentes en matrices tratadas térmicamente como los piensos, requeriría análisis adicionales a partir de un muestreo representativo de tejidos procedentes de diferentes ingredientes animales permitidos y prohibidos. En este sentido, se pretende seguir avanzando en esta línea de investigación mediante el estudio y aplicación de marcadores epigenéticos para la identificación de ingredientes permitidos en los piensos, como son los productos lácteos (ver capítulo VI. Trabajo Futuro).



## ***V. Conclusiones***

## ***Conclusions***





**PRIMERA.** Los sistemas de PCR en tiempo real utilizando cebadores y sondas TaqMan<sup>®</sup> diseñados en secuencias mitocondriales de la región D-loop y de los genes 12S y 16S del ARN ribosómico, han permitido la detección específica e inequívoca del ADN de las siguientes especies y grupos de especies animales: vaca, oveja, cabra y grupo rumiante, pollo, pavo, pato, oca y grupo aviar, cerdo, caballo, conejo, liebre, grupo lepórido y pescados.

**SEGUNDA.** Los parámetros analíticos de validación de cada sistema de PCR específico, tales como eficiencia de amplificación, linealidad, sensibilidad, veracidad y precisión, evidenciaron la capacidad de las técnicas de PCR en tiempo real desarrolladas para la detección de hasta un 0,1 % de las especies diana a partir de muestras de piensos de referencia tratados bajo las condiciones empleadas en las industrias de transformación.

**TERCERA.** La aplicación de las técnicas de PCR en tiempo real al análisis de una amplia variedad de piensos industriales elaborados con concentraciones crecientes (de 0,1 a 100 %) de proteínas animales transformadas procedentes de distintos tejidos, y tratadas a temperaturas entre 125 y 159 °C durante 20 minutos a presión hiperbárica, permitió la detección específica de hasta un 0,1 % de las correspondientes especies diana en todos los piensos procesados a 133 °C.

**CUARTA.** Las técnicas de PCR en tiempo real desarrolladas demostraron su potencial para determinar la concentración de ADN de un pienso a partir de las rectas de calibrado obtenidas de muestras de referencia. No obstante, los diferentes tratamientos térmicos aplicados a los piensos, así como el tipo de tejido animal presente en su composición, influyeron en la señal de fluorescencia, limitando la capacidad cuantitativa de la técnica desde un punto de vista práctico.

**QUINTA.** El empleo de marcadores epigenéticos basados en la metilación del ADN ha permitido la identificación específica de varios tejidos bovinos mediante una técnica de modificación del ADN con bisulfito seguida de pirosecuenciación. No obstante, la aplicabilidad de esta metodología para identificar y diferenciar ingredientes animales permitidos y prohibidos en los piensos, requeriría análisis adicionales a partir de un muestreo representativo de tejidos animales de diferentes orígenes.

**FIRST.** The real-time PCR systems using species-specific primers and TaqMan<sup>®</sup> probes designed upon D-loop, 12S and 16S ribosomal RNA mitochondrial sequences, allowed specific and unequivocal identification of DNA from the following animal species: cow, sheep, goat and ruminant group, chicken, turkey, duck, goose and avian group, swine, horse, rabbit, hare, leporids and fish.

**SECOND.** Assay performance criteria such as PCR efficiency, linear dynamic range, sensitivity, trueness and precision indicated that the real-time PCR techniques developed operated with a constant efficiency, having the potential to detect down to 0.1 % of all target species in reference feeds subjected to the processing treatments commonly used in the rendering plants.

**THIRD.** The application of the real-time PCR techniques to the analysis of a wide representation of industrial feeds containing increasing concentrations (from 0.1 to 100%) of processed animal proteins from different tissues and rendered at temperatures from 125 to 159 °C during 20 minutes at hyperbaric pressure, allowed specific detection of as low as 0.1 % of the corresponding target species in all the feed samples processed at 133 °C.

**FOURTH.** The real-time PCR techniques developed have the potential to estimate the DNA concentration of an unknown sample by using the calibration curves constructed with the reference feeds. However, results obtained suggest that the real quantitative capability of the assay is limited by the existing variability in terms of composition and processing treatments of feeds, which affect the amount of amplifiable DNA.

**FIFTH.** The use of epigenetic markers based on DNA methylation has allowed the specific identification of various bovine tissues using bisulfite modification and pyrosequencing. However, the applicability of this methodology to discriminate between permitted and banned feed ingredients requires further analysis using a representative sampling of tissue materials from different origins.



## ***VI. Trabajo Futuro***





## VI. EVALUACIÓN DE MARCADORES EPIGENÉTICOS DE METILACIÓN DEL ADN ESPECÍFICOS DE TEJIDO PARA LA IDENTIFICACIÓN DE INGREDIENTES LÁCTEOS EN PIENSOS

Como ya se ha señalado, una de las limitaciones de la metodología de PCR en tiempo real aplicada al control de autenticidad de piensos está relacionada con la detección de ingredientes autorizados en los piensos para la alimentación animal. Este inconveniente plantea la necesidad de desarrollar métodos analíticos complementarios a las técnicas de PCR en tiempo real, basados en marcadores que permitan identificar y diferenciar el ADN procedente de material animal prohibido de aquel procedente de ingredientes autorizados en la elaboración de los piensos. En el trabajo desarrollado durante la estancia predoctoral en el Laboratorio Comunitario de Referencia para las Proteínas Animales en los piensos (EURL-AP, Bélgica) se evaluó el potencial de la región promotora del gen GFAP como marcador epigenético específico de tejido para la identificación y diferenciación de ingredientes bovinos en piensos. Los resultados obtenidos evidenciaron la utilidad de la metodología desarrollada para la diferenciación específica de tejido nervioso de vaca de otros tejidos no neuronales. Sin embargo, los ensayos preliminares enfocados a evaluar su aplicabilidad a matrices procesadas como los piensos indicaron que el empleo de temperaturas elevadas influía de forma variable sobre la metilación del ADN, en función del tipo de tejido tratado. Con el fin de determinar de una forma más concluyente la influencia de los tratamientos térmicos sobre los patrones de metilación tisular, sería necesario ampliar el número de ensayos partiendo de un muestreo representativo de tejidos procedentes de diferentes ingredientes animales permitidos y prohibidos susceptibles de incorporarse a los piensos.

Los productos derivados de la leche aportan una fuente importante de minerales y vitaminas en la alimentación animal (FAO, 2011) y constituyen uno de los principales grupos de materias primas autorizadas por la Unión Europea (UE) para su uso en las formulaciones de los piensos animales (Reglamento UE 68/2013, DOUE de 30 de enero de 2013). Teniendo en cuenta los aspectos señalados, y para complementar las técnicas de PCR en tiempo real desarrolladas en esta Tesis Doctoral, se propone como trabajo futuro la identificación de derivados lácteos permitidos en los piensos y su diferenciación de otras fuentes de ADN bovino prohibidas, mediante el empleo de marcadores epigenéticos basados en regiones diferencialmente metiladas específicas de tejido mamario de vaca.

En los últimos años, se han publicado varios estudios que describen una correlación inversa entre el estado de metilación de la región promotora de genes que codifican para proteínas lácteas y su expresión en las células de las glándulas mamarias de vaca (Rijnkels y col., 2010). Las proteínas lácteas representan la fracción más compleja de la leche y se dividen en dos grupos bien diferenciados: las caseínas y las proteínas del suero. Las caseínas bovinas constituyen el 80 % de las proteínas de la leche de vaca e incluyen 4 familias:  $\alpha_{s1}$ -caseína ( $\alpha_{s1}$ -CN),  $\alpha_{s2}$ -caseína ( $\alpha_{s2}$ -CN),  $\beta$ -caseína ( $\beta$ -CN) y

$\kappa$ -caseína ( $\kappa$ -CN) (Farrell y col., 2004). En concreto, la  $\alpha_{s1}$ -CN es la familia de caseínas más abundante en la leche de vaca, y se expresa en las células epiteliales de las glándulas mamarias durante la lactancia. La expresión de los genes de la caseína y la lactoalbúmina, así como de otros genes necesarios para la síntesis de ácidos grasos y lactosa, está regulada por hormonas lactogénicas como la prolactina. La liberación de la hormona prolactina activa los factores de transcripción de la familia de las proteínas STAT (*Signal Transducers and Activators of Transcription*), que interaccionan con secuencias promotoras específicas activando la transcripción génica (Hennighausen y col., 1997; Yu-Lee y col., 1998; Groner, 2002).

Vanselow y col. (2006) identificaron y caracterizaron un potenciador del factor de transcripción STAT5 localizado ~10 kb en flujo ascendente respecto del gen bovino de la  $\alpha_{s1}$ -caseína. Empleando una técnica de secuenciación con tratamiento de bisulfito, estos autores cuantificaron el estado de metilación de tres dinucleótidos CpG situados en el extremo 5' de la región potenciadora. Los resultados obtenidos demostraron que el porcentaje de citosinas metiladas presentes en el promotor del gen  $\alpha_{s1}$ -caseína en el tejido mamario procedente de ubres lactantes era inferior al resto de tejidos analizados en las tres posiciones CpG descritas, pudiendo establecerse una zona con patrones de hipometilación específicos de este tejido. Con el fin de determinar la posible utilidad de este marcador epigenético en el desarrollo del trabajo propuesto, se llevó a cabo un análisis preliminar de la secuencia nucleotídica bovina correspondiente a la región promotora del gen que codifica la proteína  $\alpha_{s1}$ -CN. Este análisis permitió la identificación de la secuencia de unión del factor de transcripción STAT5, así como de los tres dinucleótidos CpG previamente descritos por Vanselow y col. (2006) (Figura 8, pág. 228). Una vez seleccionado el marcador epigenético de interés, la metodología del trabajo a seguir para la identificación específica del ADN procedente de la leche sería la siguiente:

1. Diseñar una pareja de cebadores para la amplificación de un fragmento de ADN en la región de interés, que contenga los tres dinucleótidos CpG descritos. Uno de los cebadores se marcará con una molécula de biotina para su posterior inmovilización durante las reacciones de pirosecuenciación. Asimismo, se diseñará un cebador de secuenciación que hibride en una región específica del producto de PCR y permita el análisis del fragmento diana que contiene las tres posiciones CpG.
2. Preparar el ADN extraído a partir de matrices lácteas y otros tejidos de origen bovino mediante su tratamiento con bisulfito. Se empleará el kit comercial *EpiTect® Fast DNA Bisulfite* (QIAGEN GmbH, Hilden, Alemania).
3. Poner a punto una técnica de PCR para la amplificación selectiva de la región diana del gen que codifica la proteína  $\alpha_{s1}$ -CN, así como una técnica de pirosecuenciación para la secuenciación y el análisis cuantitativo del estado de metilación de los tres dinucleótidos CpG descritos en esta zona. Para ello será necesario:

– Llevar a cabo las reacciones de pirosecuenciación en el *PyroMark*<sup>®</sup> Q24 *Pyrosequencer* (QIAGEN GmbH, Hilden, Alemania). Los productos de PCR serán inmovilizados y desnaturalizados mediante el kit comercial *PyroMark*<sup>®</sup> Q24 (QIAGEN GmbH, Hilden, Alemania) para la hibridación con el cebador de secuenciación.

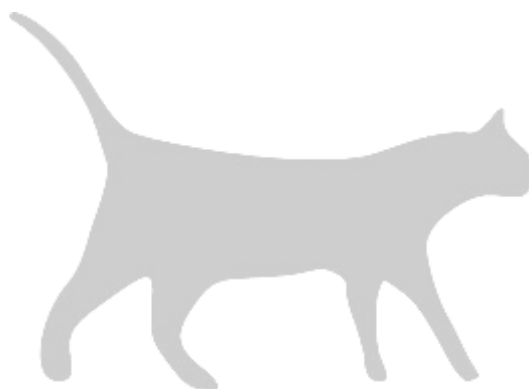
– Analizar los datos obtenidos en el Pirograma<sup>®</sup> con el software *PyroMark*<sup>®</sup> Q24 *Assay* (QIAGEN GmbH, Hilden, Alemania) para el estudio cuantitativo del estado de metilación correspondiente a cada una de las tres posiciones CpG analizadas.

**4.** Evaluar la aplicabilidad de la metodología propuesta a la detección de ingredientes lácteos y su diferenciación de otros componentes bovinos empleados en la formulación de los piensos.

10	20	30	40	50	60
----	----	----	----	----	----
gctaagactttgtgctcccactgcagggggcttgggttcaatcc	<b>ctgg</b>	<b>tcag</b>	<b>gga</b>	<b>act</b>	<b>g</b>
70	80	90	100	110	120
----	----	----	----	----	----
<b>atccc</b>	<b>acatg</b>	<b>tcacaa</b>	<b>actaa</b>	<b>gaccta</b>	<b>agtgtcacaagtaagac</b>
130	140	150	160	170	180
----	----	----	----	----	----
<b>taaataa</b>	<b>agaaa</b>	<b>at</b>	<b>ttttt</b>	<b>aaatgtg</b>	<b>ctagataaataacagcttgcactgcttttaaaa</b>
190	200	210	220	230	240
----	----	----	----	----	----
<b>gactatgg</b>	<b>ctccattt</b>	<b>gagc</b>	<b>gttgg</b>	<b>cactacaataatcag</b>	<b>tacattgaagggatgac</b>
250	260	270	280	290	300
----	----	----	----	----	----
<b>cctt</b>	<b>gtctc</b>	<b>cttaggtgac</b>	<b>c</b>	<b>gctcaga</b>	<b>aaacaaaggaccc</b>
310	320	330	340	350	360
----	----	----	----	----	----
<b>tgaattg</b>	<b>ttggaac</b>	<b>agggagg</b>	<b>gctctat</b>	<b>taataactt</b>	<b>ctttaac</b>
370	380	390	400	410	420
----	----	----	----	----	----
<b>agacagga</b>	<b>agagga</b>	<b>aggtctt</b>	<b>ggagatac</b>	<b>ctggactga</b>	<b>aaacaatccatgaccatcctgac</b>
430	440	450	460	470	480
----	----	----	----	----	----
<b>ttgaa</b>	<b>acagca</b>	<b>agagga</b>	<b>agctatg</b>	<b>acaccagga</b>	<b>agagctgggg</b>
490	500	510	520	530	540
----	----	----	----	----	----
<b>agagttga</b>	<b>agagc</b>	<b>actgtga</b>	<b>gaacttc</b>	<b>acctcaccac</b>	<b>ctaaggagagagtgccagcctttc</b>
550	560	570	580	590	600
----	----	----	----	----	----
<b>aggcatctg</b>	<b>cc</b>	<b>ttc</b>	<b>ctc</b>	<b>gaa</b>	<b>ggaaaatttctaa</b>
					<b>ttc</b>
					<b>tcagaa</b>
					<b>tcaagttcaaattcttcc</b>

**Figura 8.** Secuencia parcial de la región promotora del gen que codifica para la proteína  $\alpha_{s1}$ -caseína de vaca (*Bos taurus*) (número de acceso: AC\_000163). Los nucleótidos en negrita indican la posición de la región de interés. Las posiciones CpG están sombreadas. La secuencia de unión del factor de transcripción STAT5 está en negrita y subrayada.

## ***VII. Bibliografía***







## A

- AARTS, H.J.M., BOUW, E.M., BUNTJER, J.B., LENSTRA, J.A. y VAN RAAMSDONK, L.W.D. (2006). Detection of bovine meat and bone meal in animal feed at a level of 0.1%. **Journal of AOAC International** 89, 1443-1446.
- ABBAS, O., FERNÁNDEZ PIERNA, J.A., BOIX, A., VON HOLST, C., DARDENNE, P. y BAETEN, V. (2010a). Key parameters for the development of a NIR microscopic method for the quantification of processed by-products of animal origin in compound feedingstuffs. **Analytical and Bioanalytical Chemistry** 397, 1965-1973.
- ABBAS, O., FERNÁNDEZ PIERNA, J.A., DARDENNE, P. y BAETEN, V. (2010b). Near-infrared microscopic methods for the detection and quantification of processed by-products of animal origin. En: Sensing for agriculture and food quality and safety II. Moon, K., Shu-I, T., Kaunglin, C. (Eds.). **Proceedings of the Society of Photographic Instrumentation Engineers**, 7676.
- ALI, M.E., KASHIF, M., UDDIN, K., HASHIM, U., MUSTAFA, S. y CHE MAN, Y.B. (2012). Species authentication methods in foods and feeds: the present, past, and future of halal forensics. **Food Analytical Methods** 5, 935-955.
- ALI, M.E., RAZZAK, M.A. y HAMID, S.B.A. (2014). Multiplex PCR in species authentication: probability and prospects - a review. **Food Analytical Methods** 7, 1933-1949.
- ALI, M.E., RAZZAK, M.A., HAMID, S.B.A., RAHMAN, M.M., AMIN, M.A., RASHID, N.R. y ASING. (2015). Multiplex PCR assay for the detection of five meat species forbidden in Islamic foods. **Food Chemistry** 177, 214-224.
- AMARAL, J.S., SANTOS, C.G., MELO, V.S., OLIVEIRA, M.B.P.P. y MAFRA, I. (2014). Authentication of a traditional game meat sausage (*Alheira*) by species-specific PCR assays to detect hare, rabbit, red deer, pork and cow meats. **Food Research International** 60, 140-145.
- ANFAAC (Asociación Nacional de Fabricantes de Alimentos para Animales de Compañía) (2013). Macromagnitudes del sector.

Disponible online en:  
<http://www.anfaac.org/>.

- ARSLAN, A., ILHAK, O.I. y CALICIOGLU, M. (2006). Effect of method of cooking on identification of heat processed beef using polymerase chain reaction (PCR) technique. **Meat Science** 72, 326-330.
- ASENSIO, L., GONZÁLEZ, I., GARCÍA, T. y MARTÍN, R. (2008). Determination of food authenticity by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Food Control** 19, 1-8.
- ASENSIO, L., GONZÁLEZ, I., ROJAS, M., GARCÍA, T. y MARTÍN, R. (2009). PCR-based methodology for the authentication of grouper (*Epinephelus marginatus*) in commercial fish fillets. **Food Control** 20, 618-622.
- ASHOOR, S.H., MONTE, W.C. y STILES, P.G. (1988). Liquid chromatographic identification of meats. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists** 71, 397-403.

## B

- BAETEN, V., MICHOTTE-RENIER, A., SINNAEVE, G. y DARDENNE, P. (2001). Analyses of feedingstuffs by near-infrared microscopy (NIRM): detection and quantification of meat-and-bone meal (MBM). En: Proceeding of the 6<sup>th</sup> Food Authenticity and Safety International Symposium (FACIS), Nantes, Francia, 1-11.
- BAETEN, V., VON HOLST, C., GARRIDO, A., VANCUTSEM, J., RENIER, A.M. y DARDENNE, P. (2005). Detection of banned meat and bone meal in feedstuffs by near-infrared microscopic analysis of the dense sediment fraction. **Analytical and Bioanalytical Chemistry** 382, 149-157.
- BAI, W.L., YIN, R.H., ZHAO, S.J., DOU, Q.L., YANG, J.C., JIANG, W.Q., ZHAO, Z.H. y LUO, G.B. (2009). Rapid detection of bovine milk in yak milk using a polymerase chain reaction technique. **Journal of Dairy Science** 92, 1354-1360.
- BAI, W.L., YIN, R.H., ZHAO, S.J., LI, C., MA, Z.J., YIN, R.L., LUO, G.B. y ZHAO, Z.H. (2010). A PCR assay for sex determination of yak (*Bos grunniens*) meat by amplification of the

- male-specific SRY gene. **Food Control** 21, 726-731.
- BAINS, W. y SMITH, G.C. (1988). A novel method for nucleic acid sequence determination. **Journal of Theoretical Biology** 135, 303-307.
- BALIZS, G., WEISE, C., ROZYCKI, C., OPIALLA, T., SAWADA, S., ZAGON, J. y LAMPEN, A. (2011). Determination of osteocalcin in meat and bone meal of bovine and porcine origin using matrix-assisted laser desorption ionization/time-of-flight mass spectrometry and high-resolution hybrid mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta** 693, 89-99.
- BALLIN, N.Z., VOGENSEN, F.K. y KARLSSON, A.H. (2009). Species determination - can we detect and quantify meat adulteration? **Meat Science** 83, 165-174.
- BALLIN, N.Z. (2010). Authentication of meat and meat products. **Meat Science** 86, 577-587.
- BARBER, G.D., GIVENS, D.I., KRIDIS, M.S., OFFER, N.W. y MURRAY, I. (1990). Prediction of the organic matter digestibility of grass silage. **Animal Feed Science and Technology** 28, 115-128.
- BAUTISTA, M. (2009). Avances en la aplicación de la espectroscopia NIR en la industria farmacéutica. Introducción a PAT y técnicas de imagen. Tesis doctoral, Universidad Autónoma de Barcelona, Departamento de Química. Disponible online en: <http://hdl.handle.net/10803/3295>.
- BEKTAS, Y. y BELDUZ, A.O. (2009). PCR based identification and discrimination of *Caranx rhonchus* (Pisces, Carangidae) based on nuclear and mtDNA sequences. **Journal of Animal and Veterinary Advances** 8, 518-525.
- BELLAGAMBA, F., VALFRÈ, F., PANSERI, S. y MORETTI, V.M. (2003). Polymerase chain reaction-based analysis to detect terrestrial animal protein in fish meal. **Journal of Food Protection** 66, 682-685.
- BELLAGAMBA, F., COMINCINI, S., FERRETTI, L., VALFRÉ, F. y MORETTI, V.M. (2006). Application of quantitative real-time PCR in the detection of prion-protein gene species-specific DNA sequences in animal meals and feedstuffs. **Journal of Food Protection** 69, 891-896.
- BELLORINI, S., STRATHMANN, S., BAETEN, V., FUMIÈRE, O., BERBEN, G., TIRENDI, S. y VON HOLST, C. (2005). Discriminating animal fats and their origins: assessing the potentials of Fourier transform infrared spectroscopy, gas chromatography, immunoassay and polymerase chain reaction technique. **Analytical and Bioanalytical Chemistry** 382, 1073-1083.
- BENEDETTO, A., ABETE, M.C. y SQUADRONE, S. (2011). Towards a quantitative application of real-time PCR technique for fish DNA detection in feedstuffs. **Food Chemistry** 126, 1436-1442.
- BINLADEN, J., GILBERT, M.T.P., BOLLBACK, J.P., PANITZ, F., BENDIXEN, C., NIELSEN, R. y WILLERSLEV, E. (2007). The use of coded PCR primers enables high-throughput sequencing of multiple homolog amplification products by 454 parallel sequencing. **PLoS One** 2, e197.
- BOIX, A., VON HOLST, C., BAETEN, V., BERBEN, G. y VANCUTSEM, J. (2004). Determination of processed animal proteins (PAPs) including meat and bone meals (MBM) in feed. Part I: Intercomparison study for the determination of PAPs in feed using microscopy. Part II: Prevalidation study for the detection of PAPs in feed by immunoassays. Joint Research Centre Institute for Reference Materials and Measurements (IRMM), Geel, Bélgica.
- BOIX, A., BELLORINI, S. y VON HOLST, C. (2010). Validation of an analytical method for the determination of glyceroltriheptanoate (GTH) in processed animal byproducts. **Food Additives and Contaminants** 27, 793-800.
- BOIX, A., FERNÁNDEZ PIERNA, J.A., VON HOLST, C. y BAETEN, V. (2012). Validation of a near infrared microscopy method for the detection of animal products in feedingstuffs: results of a collaborative study. **Food Additives and Contaminants** 29, 1872-1880.
- BOTTERO, M.T., CIVERA, T., NUCERA, D. y TURI, R.M. (2003a). Design of universal primers for the detection of animal tissues in feedstuff. **Veterinary Research Communications** 27, 667-669.

- BOTTERO, M.T., DALMASSO, A., NUCERA, D., TURI, R.M., ROSATI, S., SQUADRONE, S., GORIA, M. y CIVERA, T. (2003b). Development of a PCR assay for the detection of animal tissues in ruminant feeds. **Journal of Food Protection** 66, 2307-2312.
- BOTTERO, M.T. y DALMASSO, A. (2011). Animal species identification in food products: evolution of biomolecular methods. **The Veterinary Journal** 190, 34-38.
- BRAASCH, D.A. y COREY, D.R. (2001). Locked nucleic acid (LNA): fine-tuning the recognition of DNA and RNA. **Chemistry & Biology** 8, 1-7.
- BRC (British Retail Consortium) (2015). Norma mundial BRC de seguridad alimentaria, edición 7. Disponible online en: <http://www.brcglobalstandards.com/>.
- BREMER, M.G.E.G., MARGRY, R.J.C.F., VAESSEN, J.C.H., VAN DOREMALEN, A.M.H., VAN DER PALEN, J.G.P., VAN KAATHOVEN, R.G.C., KEMMERS-VONCKEN, A.E.M. y VAN RAAMSDONK, L.W.D. (2013). Evaluation of a commercial ELISA for detection of ruminant processed animal proteins in non-ruminant processed animal proteins. **Journal of AOAC Internacional** 96, 552-559.
- BRENNER, S., WILLIAMS, S.R., VERMAAS, E.H., STORCK, T., MOON, K., MCCOLLUM, C., MAO, J.I., LUO, S., KIRCHNER, J.J., ELETR, S., DUBRIDGE, R.B., BURCHAM, T. y ALBRECHT, G. (2000). *In vitro* cloning of complex mixtures of DNA on microbeads: physical separation of differentially expressed cDNAs. **Proceeding of National Academy Sciences of the United States of America** 97, 1665-1670.
- BRODMANN, P.D. y MOOR, D. (2003). Sensitive and semi-quantitative TaqMan<sup>TM</sup> real-time polymerase chain reaction systems for the detection of beef (*Bos taurus*) and the detection of the family *Mammalia* in food and feed. **Meat Science** 65, 599-607.
- BROEDERS, S., HUBER, I., GROHMANN, L., BERBEN, G., TAVERNIERS, I., MAZZARA, M., ROOSENS, N. y MORISSET, D. (2014). Guidelines for validation of qualitative real-time PCR methods. **Trends in Food Science & Technology** 37, 115-126.
- BUCKLEY, M., COLLINS, M. y THOMAS-OATES, J. (2008). A method of isolating the collagen (I)  $\alpha 2$  chain carboxyteleopeptide for species identification in bone fragments. **Analytical Biochemistry** 374, 325-334.
- BUCKLEY, M., COLLINS, M., THOMAS-OATES, J. y WILSON, J.C. (2009). Species identification by analysis of bone collagen using matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry** 23, 3843-3854.
- BUCKLEY, M., PENKMAN, K.E.H., WESS, T.J., REANEY, S. y COLLINS, M.J. (2012). Protein and mineral characterisation of rendered meat and bone meal. **Food Chemistry** 134, 1267-1278.
- BUSTIN, S.A., BENES, V., GARSON, J.A., HELLEMANS, J., HUGGETT, J., KUBISTA, M., MUELLER, R., NOLAN, T., PFAFFL, M.W., SHIPLEY, G.L., VANDESOMPELE, J. y WITTEWIT, C.T. (2009). The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clinical Chemistry** 55, 611-622.
- ## C
- CALVO, J.H., RODELLAR, C., ZARAGOZA, P. y OSTA, R. (2002). Beef- and bovine-derived material identification in processed and unprocessed food and feed by PCR amplification. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 50, 5262-5264.
- CAMMÀ, C., DI DOMENICO, M. y MONACO, F. (2012). Development and validation of fast real-time PCR assays for species identification in raw and cooked meat mixtures. **Food Control** 23, 400-404.
- CANARD, B. y SARFATI, R. (1994). DNA polymerase fluorescent substrates with reversible 3'-tags. **Gene** 148, 1-6.
- CASAZZA, A.P., GAVAZZI, F., MASTROMAURO, F., GIANI, S. y BREVIARIO, D. (2011). Certifying the feed to guarantee the quality of traditional food: an easy way to trace plant species in complex mixtures. **Food Chemistry** 124, 685-691.
- CATANESE, G., MANCHADO, M., FERNÁNDEZ-TRUJILLO, A. y INFANTE, C. (2010). A multiplex-PCR assay for the authentication

- of mackerels of the genus *Scomber* in processed fish products. **Food Chemistry** 122, 319-326.
- CAWTHORN, D.-M., STEINMAN, H.A. y HOFFMAN, L.C. (2013). A high incidence of species substitution and mislabelling detected in meat products sold in South Africa. **Food Control** 32, 440-449.
- CAWTHRAW, S., SAUNDERS, G.C., MARTIN, T.C., SAWYER, J., WINDL, O. y REANEY, S.D. (2009). Real-time PCR detection and identification of prohibited mammalian and avian material in animal feeds. **Journal of Food Protection** 72, 1055-1062.
- CCMAS (Codex Committee on Methods of Analysis and Sampling) (2010). Guidelines on performance criteria and validation of methods for detection, identification and quantification for specific DNA sequences and specific proteins in foods (Rep. No. CAC/GL 74-2010). Disponible online en: [http://www.fao.org/fileadmin/user\\_upload/gmfp/resources/CXG\\_074e.pdf](http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/gmfp/resources/CXG_074e.pdf).
- CHEN, F.-C., HSIEH, Y.-H.P. y BRIDGMAN, R.C. (2002). Monoclonal antibodies against troponin I for the detection of rendered muscle tissues in animal feedstuffs. **Meat Science** 62, 405-412.
- CHEN, F.-C., HSIEH, Y.-H.P. y BRIDGMAN, R.C. (2004). Monoclonal antibody-based sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for sensitive detection of prohibited ruminant proteins in feedstuffs. **Journal of Food Protection** 67, 544-549.
- CHEN, L., YANG, Z. y HAN, L. (2013). A review on the use of near-infrared spectroscopy for analyzing feed protein materials. **Applied Spectroscopy Reviews** 48, 509-522.
- CHEN, Y., WU, Y., WANG, J., XU, B., ZHONG, Z. y XIA, J. (2009). Identification of cervidae DNA in feedstuff using a real-time polymerase chain reaction method with the new fluorescence intercalating dye EvaGreen. **Journal of AOAC International** 92, 175-180.
- CHENG, X., HE, W., HUANG, F., HUANG, M. y ZHOU, G. (2014). Multiplex real-time PCR for the identification and quantification of DNA from duck, pig and chicken in Chinese blood curds. **Food Research International** 60, 30-37.
- CHENG, Y.H., WEN, C.M., DING, S.T., KAO, C.C. y KUO, T.Y. (2003). Detecting meat-and-bone meal in ruminant's feeds by species-specific PCR. **Journal of Animal and Feed Science** 12, 849-858.
- CHIANINI, F., FERNÁNDEZ-BORGES, N., VIDAL, E., GIBBARD, L., PINTADO, B., DE CASTRO, J., PRIOLA, S.A., HAMILTON, S., EATON, S.L., FINLAYSON, J., PANG, Y., STEELE, P., REID, H.W., DAGLEISH, M.P. y CASTILLA, J. (2012). Rabbits are not resistant to prion infection. **Proceeding of National Academy Sciences of the United States of America** 109, 5080-5085.
- CHIAPPINI, B., BRAMBILLA, G., AGRIMI, U., VACCARI, G., AARTS, H.J.M., BERBEN, G., FREZZA, D. y GIAMBRA, V. (2005). Real-time polymerase chain reaction approach for quantitation of ruminant-specific DNA to indicate a correlation between DNA amount and meat and bone meal heat treatments. **Journal of AOAC International** 88, 1399-1403.
- CHISHOLM, J., CONYERS, C., BOOTH, C., LAWLEY, W. y HIRD, H. (2005). The detection of horse and donkey using real-time PCR. **Meat Science** 70, 727-732.
- CHISHOLM, J., CONYERS, C. y HIRD, H. (2008). Species identification in food products using the bioMérieux FoodExpert-ID® system. **European Food Research and Technology** 228, 39-45.
- COLGAN, S., O'BRIEN, L., MAHER, M., SHILTON, N., McDONNELL, K. y WARD, S. (2001). Development of a DNA-based assay for species identification in meat and bone meal. **Food Research International** 34, 409-414.
- COLLINS, M.J., NIELSEN-MARSH, C.M., HILLER, J., SMITH, C.I., ROBERTS, J.P., PRIGODICH, R.V., WESS, T.J., CSAPÒ, J., MILLARD, A.R. y TURNER-WALKER, G. (2002). The survival of organic matter in bone: a review. **Archaeometry** 44, 383-394.
- COMISIÓN EUROPEA (2010). Segunda hoja de ruta contra las EET. Documento sobre la estrategia 2010-2015 contra las encefalopatías espongiformes transmisibles. Bruselas, 16.7.2010 COM (2010) 384 final. Disponible online en: [http://ec.europa.eu/food/food/biosafety/tse\\_bse/docs/roadmap\\_2\\_es.pdf](http://ec.europa.eu/food/food/biosafety/tse_bse/docs/roadmap_2_es.pdf).

- COMISIÓN EUROPEA (2013). Commission publishes European test results on horse DNA and Phenylbutazone: no food safety issues but tougher penalties to apply in the future to fraudulent labelling (press release). Disponible online en: [http://europa.eu/rapid/press-release\\_IP-13-331\\_en.htm](http://europa.eu/rapid/press-release_IP-13-331_en.htm).
- CONDORELLI, D.F., NICOLETTI, V.G., BARRESI, V., CARUSO, A., CONTICELLO, S., DE VELLIS, J. y GIUFFRIDA STELLA, A.M. (1994). Tissue-specific DNA methylation patterns of the rat glial fibrillary acidic protein gene. **Journal of Neuroscience Research** 39, 694-707.
- CONDORELLI, D.F., DELL'ALBNI, P., CONTICELLO, S.G., BARRESI, V., NICOLETTI, V.G., CARUSO, A., KAHN, M., VACANTI, M., ALBANESE, V., DE VELLIS, J. y GIUFFRIDA STELLA, A.M. (1997). A neural-specific hypomethylated domain in the 5' flanking region of the glial fibrillary acidic protein gene. **Developmental Neuroscience** 19, 446-456.
- COSTA, J., MAFRA, I., BEATRIZ, M. y OLIVEIRA, P.P. (2012). Advances in vegetable oil authentication by DNA-based markers. **Trends in Food Science & Technology** 26, 43-55.
- COSTA, J.M., ERNAULT, P., OLIVI, M., GAILLON, T. y ARAR, K. (2004). Chimeric LNA/DNA probes as a detection system for real-time PCR. **Clinical Biochemistry** 37, 930-932.
- COZZI, M.C., STRILLACCI, M.G., VALIATI, P., BIGHIGNOLI, B., CANCEDDA, M. y ZANOTTI, M. (2004). Mitochondrial D-loop sequence variation among Italian horse breeds. **Genetic Selection Evolution** 36, 663-672.
- COZZOLINO, D. (2002). Uso de la espectroscopia de reflectancia en el infrarrojo cercano (NIRS) en el análisis de alimentos para animales. **Agrociencia** 6, 25-32.
- COZZOLINO, D., RESTAINO, E., LA MANNA, A., FERNANDEZ, E. y FASSIO, A. (2009). Usefulness of near infrared reflectance (NIR) spectroscopy and chemometrics to discriminate between fishmeal, meat meal and soya meal samples. **Ciencia e Investigación Agraria** 36, 209-214.
- D**
- DALE, L.M., THEWIS, A., ROTAR, I., FERNÁNDEZ PIERNA, J.A., BOUDRY, C., VIDICAN, R.M. y BAETEN, V. (2012). Chemometric tools for NIRS and NIR hyperspectral imaging. **Bulletin of the University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca Agriculture** 69, 70-76.
- DALMASSO, A., FONTANELLA, E., PIATTI, P., CIVERA, T., ROSATI, S. y BOTTERO, M.T. (2004). A multiplex PCR assay for the identification of animal species in feedstuffs. **Molecular and Cellular Probes** 18, 81-87.
- DALMASSO, A., CIVERA, T., LA NEVE, F. y BOTTERO, M.T. (2011). Simultaneous detection of cow and buffalo milk in mozzarella cheese by real-time PCR assay. **Food Chemistry** 124, 362-366.
- DALTON, D.L. y KOTZE, A. (2011). DNA barcoding as a tool for species identification in three forensic wildlife cases in South Africa. **Forensic Science International** 207, 51-54.
- DE BATTISTI, C., MARCIANO, S., MAGNABOSCO, C., BUSATO, S., ARCANGELI, G. y CATTOLI, G. (2014). Pyrosequencing as a tool for rapid fish species identification and commercial fraud detection. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 62, 198-205.
- DE LA HABA, M.J., GARRIDO-VARO, A., PÉREZ-MARÍN, D.C. y GUERRERO-GINEL, J.E. (2007). Near infrared analysis as a first-line screening technique for identifying animal species in rendered animal by-product meals. **Journal of Near Infrared Spectroscopy** 15, 237-245.
- DE LA HABA, M.J., GARRIDO-VARO, A., PÉREZ-MARÍN, D.C. y GUERRERO-GINEL, J.E. (2009). Near infrared spectroscopy calibrations for quantifying the animal species in processed animal proteins. **Journal of Near Infrared Spectroscopy** 17, 109-118.
- DE LA ROZA-DELGADO, B., SOLDADO, A., MARTÍNEZ-FERNÁNDEZ, A., VICENTE, F., GARRIDO-VARO, A., PÉREZ-MARÍN, D., DE LA HABA, M.J. y GUERRERO-GINEL, J.E. (2007). Application of near-infrared microscopy (NIRM) for the detection of

- meat and bone meals animal feeds: a tool for food and feed safety. **Food Chemistry** 105, 1164-1170.
- DE SILVA, S.S. y TURCHINI, G.M. (2008). Towards understanding the impacts of the pet food industry on world fish and seafood supplies. **Journal of Agricultural and Environmental Ethics** 21, 459-467.
- DEAMER, D.W. y BRANTON, D. (2002). Characterization of nucleic acids by nanopore analysis. **Accounts of Chemical Research** 35, 817-825.
- DEATON, A.M. y BIRD, A. (2011). CpG islands and the regulation of transcription. **Genes & Development** 25, 1010-1022.
- DECISIÓN 94/381/CE de la Comisión, de 27 de junio de 1994, sobre medidas de protección contra la encefalopatía espongiforme bovina y la utilización como alimento de proteínas derivadas de mamíferos. **Diario Oficial de las Comunidades Europeas** núm. L172, de 7 de julio de 1994, 23-24. Disponible online en: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/PDF/?uri=CELEX:31994D0381&from=ES>.
- DECISIÓN 2000/766/CE del Consejo, de 4 de diciembre de 2000, relativa a determinadas medidas de protección contra las encefalopatías espongiformes transmisibles y la utilización de proteínas animales en alimentación animal. **Diario Oficial de las Comunidades Europeas** núm. L306, de 7 de diciembre de 2000, 32-33. Disponible online en: <http://www.boe.es/doue/2000/306/L00032-00033.pdf>.
- DECISIÓN 2001/9/CE de la Comisión, de 29 de diciembre de 2000, relativa a las medidas de control requeridas para la aplicación de la Decisión 2000/766/CE del Consejo relativa a determinadas medidas de protección contra las encefalopatías espongiformes transmisibles y la utilización de proteínas animales en alimentación animal. **Diario Oficial de las Comunidades Europeas** núm. L2, de 5 de enero de 2001, 32-40. Disponible online en: [http://ec.europa.eu/food/fs/bse/bse25\\_es.pdf](http://ec.europa.eu/food/fs/bse/bse25_es.pdf).
- DI PINTO, A., FORTE, V.T., CONVERSANO, M.C. y TANTILLO, G.M. (2005). Duplex polymerase chain reaction (D-PCR) for detection of pork meat in horse meat fresh sausages from Italian retail sources. **Food Control** 16, 391-394.
- DIRECTIVA 90/167/CEE del Consejo, de 26 de marzo de 1990, por la que se establecen las condiciones de preparación, de puesta en el mercado y de utilización de los piensos medicamentosos en la Comunidad. **Diario Oficial de las Comunidades Europeas** núm. L92, de 7 de abril de 1990, 42-48. Disponible online en: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/PDF/?uri=CELEX:31990L0167&from=ES>.
- DIRECTIVA 98/88/CE de la Comisión, de 13 de noviembre de 1998, por la que se establecen las directrices para la identificación de los componentes de origen animal y el cálculo de sus cantidades mediante microscopio a los efectos del control oficial de los piensos. **Diario Oficial de las Comunidades Europeas** núm. L318, de 27 de noviembre de 1998, 45-50. Disponible online en: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:1998:318:0045:0050:ES:PDF>.
- DIRECTIVA 2003/126/CE de la Comisión, de 23 de diciembre de 2003, relativa a los métodos de análisis para determinar los componentes de origen animal a los efectos del control oficial de los piensos. **Diario Oficial de la Unión Europea** núm. L339, de 24 de diciembre de 2003, 78-84. Disponible online en: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2003:339:0078:0084:ES:PDF>.
- DOOSTI, A., GHASEMI DEHKORDI, P. y RAHIMI, E. (2014). Molecular assay to fraud identification of meat products. **Journal of Food Science and Technology** 51, 148-152.
- DÖRRIES, H.H., REMUS, I., GRÖNEWALD, A., GRÖNEWALD, C. y BERGHOF-JÄGER, K. (2010). Development of a qualitative, multiplex real-time PCR kit for screening of genetically modified organism (GMOs). **Analytical and Bioanalytical Chemistry** 396, 2043-2054.
- DRMANAC, R., LABAT, I., BRUKNER, I. y CRKVENJAKOV, R. (1989). Sequencing of megabase plus DNA by hybridization: theory of the method. **Genomics** 4, 114-128.

## E

- EATON, M.J., MEYERS, G.L., KOLOKOTRONIS, S.O., LESLIE, M.S., MARTIN, A.P. y AMATO, G. (2009). Barcoding bushmeat: molecular identification of Central African and South American harvested vertebrates. **Conservation Genetics** 11, 1389-1404.
- ECKHARDT, F., LEWIN, J., CORTESE, R., RAKYAN, V.K., ATTWOOD, J., BURGER, M., BURTON, J., COX, T.V., DAVIES, R., DOWN, T.A., HAEFLIGER, C., HORTON, R., HOWE, K., JACKSON, D.K., KUNDE, J., KOENIG, C., LIDDLE, J., NIBLETT, D., OTTO, T., PETTETT, R., SEEMANN, S., THOMPSON, C., WEST, T., ROGERS, J., OLEK, A., BERLIN, K. y BECK, S. (2006). DNA methylation profiling of human chromosomes 6, 20 and 22. **Nature Genetics** 38, 1378-1385.
- EFSA (European Food Safety Authority) (2007a). Opinion of the Scientific Panel on Biological Hazards on a request from the European Parliament on the assessment of the health risks of feeding of ruminants with fishmeal in relation to the risk of TSE. **The European Food Safety Authority Journal** 443, 1-26. Disponible online en: [www.efsa.europa.eu/efsajournal](http://www.efsa.europa.eu/efsajournal).
- EFSA (European Food Safety Authority) (2007b). Opinion of the Scientific Panel on Biological Hazards on a request from the European Parliament on certain aspects related to the feeding of animal proteins to farm animals. **The European Food Safety Authority Journal** 576, 1-41. Disponible online en: [www.efsa.europa.eu/efsajournal](http://www.efsa.europa.eu/efsajournal).
- EFSA BIOHAZ (EFSA Panel on Biological Hazards) (2011). Scientific opinion on the revision of the quantitative risk assessment (QRA) of the BSE risk posed by processed animal proteins (PAPs). **The European Food Safety Authority Journal** 9, 1947-2026. Disponible online en: [www.efsa.europa.eu/efsajournal](http://www.efsa.europa.eu/efsajournal).
- EKINS, J., PETERS, S.M., JONES, Y.L., SWAIM, H., HA, T., LA NEVE, F., CIVERA, T., BLACKSTONE, G., VICKERY, M.C.L., MARION, B., MYERS, M.J. y YANCY, H.F. (2012). Development of a multiplex real-time PCR assay for the detection of ruminant DNA. **Journal of Food Protection** 75, 1107-1112.
- ENGL (European Network of GMO Laboratories) (2008). Definition of minimum performance requirements for analytical methods of GMO testing. Disponible online en: [http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/doc/Min\\_Perf\\_Requirements\\_Analytical\\_methods.pdf](http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/doc/Min_Perf_Requirements_Analytical_methods.pdf).
- EUGSTER, A., RUF, J., RENTSCH, J. y KÖPPEL, R. (2009). Quantification of beef, pork, chicken and turkey proportions in sausages: use of matrix-adapted standards and comparison of single versus multiplex PCR in an interlaboratory trial. **European Food Research and Technology** 230, 55-61.
- EVANS, J.J., WICTUM, E.J., PENEDO, M.C.T. y KANTHASWAMY, S. (2007). Real-time polymerase chain reaction quantification of canine DNA. **Journal of Forensic Science** 52, 93-96.

## F

- FAIRBROTHER, K.S., HOPWOOD, A.J., LOCKLEY, A.K. y BARDSLEY, R.G. (1998). Meat speciation by restriction fragment length polymorphism. Analysis using an  $\alpha$ -Actin cDNA probe. **Meat Science** 50, 105-114.
- FAJARDO, V., GONZÁLEZ, I., MARTÍN, I., ROJAS, M., HERNÁNDEZ, P.E., GARCÍA, T. y MARTÍN, R. (2008). Real-time PCR for detection and quantification of red deer (*Cervus elaphus*), fallow deer (*Dama dama*), and roe deer (*Capreolus capreolus*) in meat mixtures. **Meat Science** 79, 289-298.
- FAJARDO, V., GONZÁLEZ, I., MARTÍN, I., ROJAS, M., GARCÍA, T. y MARTÍN, R. (2010). A review of current PCR-based methodologies for the authentication of meats from game animal species. **Trends in Food Science & Technology** 21, 408-421.
- FANG, X. y ZHANG, C. (2016). Detection of adulterated murine components in meat products by TaqMan<sup>®</sup> real-time PCR. **Food Chemistry** 192, 485-490.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) (2011). Rearing young ruminants on milk replacers and starter feeds. FAO animal production and health manual. No 13. Rome. Disponible online en: <http://www.fao.org/docrep/014/i2439e/i2439e00.pdf>.

- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) e IFIF (International Feed Industry Federation) (2014). Buenas prácticas para la industria de piensos - implementación del código de prácticas sobre buena alimentación animal. Manual FAO de producción y sanidad animal. No 9. Roma. Disponible online en: <http://www.ifif.org/uploadImage/2014/3/19/5e53ee6ab3389442ef23054dd32632aa1395243927.pdf>.
- FARAJOLLAHI, H., ASLAMINEJAD, A.A., NASSIRY, M.R., SEKHAVATI, M.H., MAHDAVI, M. y JAVADMANESH, A. (2009). Development and use of quantitative competitive PCR assay for detection of poultry DNA in fish meal. **Journal of Animal and Feed Sciences** 18, 733-742.
- FARRELL, H.M.Jr., JIMENEZ-FLORES, R., BLECK, G.T., BROWN, E.M., BUTLER, J.E., CREAMER, L.K., HICKS, C.L., HOLLAR, C.M., NG-KWAI-HANG, K.F. y SWAISGOOD, H.E. (2004). Nomenclature of the proteins of cows' milk - sixth revision. **Journal of Dairy Science** 87, 1641-1674.
- FEDIAF (Federación Europea de la Industria de Alimentos para Animales de Compañía, *The European Pet Food Industry Federation*) (2011). Código de buenas prácticas de etiquetado de alimentos para animales de compañía. Disponible online en: <http://www.fediaf.org/self-regulation/labelling/>.
- FEDIAF (Federación Europea de la Industria de Alimentos para Animales de Compañía, *The European Pet Food Industry Federation*) (2012). Facts & figures 2012. Disponible online en: <http://www.fediaf.org/facts-figures/>.
- FEFAC (Federación Europea de Fabricantes de Piensos Compuestos, *Federation Europeenne des Fabricants d'Aliments Composes pour Animaux*) (2012). Anuario de estadística para alimentos y piensos. Disponible online en: <http://www.fefac.eu/files/51501.pdf>.
- FERNÁNDEZ PIERNA, J.A., BAETEN, V., MICHOTTE RENIER, A., COGDILL, R.P. y DARDENNE, P. (2004). Combination of support vector machines (SVM) and near-infrared (NIR) imaging spectroscopy for the detection of meat and bone meal (MBM) in compound feeds. **Journal of Chemometrics** 18, 341-349.
- FERNÁNDEZ PIERNA, J.A., DARDENNE, P. y BAETEN, V. (2010). In-house validation of a near infrared hyperspectral imaging method for detecting processed animal proteins in compound feed. **Journal of Near Infrared Spectroscopy** 18, 121-133.
- FERNÁNDEZ PIERNA, J.A., VERMEULEN, P., AMAND, O., TOSSENS, A., DARDENNE, P. y BAETEN, V. (2012). NIR hyperspectral imaging spectroscopy and chemometrics for the detection of undesirable substances in food and feed. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems** 117, 233-239.
- FERNÁNDEZ PIERNA, J.A., BOIX, A., SLOWIKOWSKI, B., VON HOLST, C., MAUTE, O., HAN, L., AMATO, G., DE LA ROZA-DELGADO, B., PÉREZ-MARÍN, D., LILLEY, G., DARDENNE, P. y BAETEN, V. (2013). Standardization of NIR microscopy spectra obtained from inter-laboratory studies by using a standardization cell. **Biotechnology, Agronomy, Society and Environment** 17, 547-555.
- FERNÁNDEZ-IBÁÑEZ, V., SOLDADO, A., VICENTE, F., MARTÍNEZ-FERNÁNDEZ, B. y DE LA ROZA-DELGADO, B. (2008). Particle size optimisation in development of near infrared microscopy methodology to build spectral libraries of animal feeds. **Journal of Near Infrared Spectroscopy** 16, 243-248.
- FERNÁNDEZ-IBÁÑEZ, V., FEARN, T., SOLDADO, A. y DE LA ROZA-DELGADO, B. (2010). Development and validation of near infrared microscopy spectral libraries of ingredients in animal feed as a first step to adopting traceability and authenticity as guarantors of food safety. **Food Chemistry** 121, 871-877.
- FREZZA, D., FAVARO, M., VACCARI, G., VON HOLST, C., GIAMBRA, V., ANKLAM, E., BOVE, D., BATTAGLIA, P.A., AGRIMI, U., BRAMBILLA, G., AJMONE-MARSAN, P. y TARTAGLIA, M. (2003). A competitive polymerase chain reaction-based approach for the identification and semiquantification of mitochondrial DNA in differently heat-treated bovine meat and bone meal. **Journal of Food Protection** 66, 103-109.



- FREZZA, D., GIAMBRA, V., CHEGDANI, F., FONTANA, C., MACCABIANI, G., LOSIO, N., FAGGIONATO, E., CHIAPPINI, B., VACCARI, G., VON HOLST, C., LANNI, L., SACCARES, S. y AJMONE-MARSAN, P. (2008). Standard and Light-Cycler PCR methods for animal DNA species detection in animal feedstuffs. **Innovative Food Science & Emerging Technologies** 9, 18-23.
- FRUMKIN, D., WASSERSTROM, A., BUDOWLE, B. y DAVIDSON, A. (2011). DNA methylation-based forensic tissue identification. **Forensic Science International: Genetics** 5, 517-524.
- FUMIÈRE, O., DUBOIS, M., BAETEN, V., VON HOLST, C. y BERBEN, G. (2006). Effective PCR detection of animal species in highly processed animal byproducts and compound feeds. **Analytical and Bioanalytical Chemistry** 385, 1045-1054.
- FUMIÈRE, O., BERBEN, G. y BAETEN, V. (2008). Evaluation of the neogen immunoassay «*Reveal® for Ruminant*» for the detection of ruminant proteins in processed animal proteins. Addendum: preliminary tests with the «*MELISA-TEK™*» ruminant kit from ELISA technologies, inc., Gainesville, FL, USA. Report, October 2008, CRA-W, CRL-AP, Gembloux, Belgium. Disponible online en: [http://www.eurl.craw.eu/img/page/pcr/Neogen\\_final\\_report\\_October\\_2008.pdf](http://www.eurl.craw.eu/img/page/pcr/Neogen_final_report_October_2008.pdf).
- FUMIÈRE, O., VEYS, P., BOIX, A., VON HOLST, C., BAETEN, V. y BERBEN, G. (2009a). Methods of detection, species identification and quantification of processed animal proteins in feedingstuffs. **Biotechnology, Agronomy, Society and Environment** 13, 59-70.
- FUMIÈRE, O., BAETEN, V. y BERBEN, G. (2009b). Evaluation of the «*MELISA-TEK™* Ruminant kit» (ELISA technologies, Inc., Gainesville, FL, USA) for the detection of ruminant proteins in processed animal proteins. Report, July 2009, CRA-W, CRL-AP, Gembloux, Belgium. Disponible online en: [http://www.eurl.craw.eu/img/page/pcr/MELISA\\_TEK\\_final\\_report\\_1.pdf](http://www.eurl.craw.eu/img/page/pcr/MELISA_TEK_final_report_1.pdf).
- FUMIÈRE, O., BAETEN, V. y BERBEN, G. (2010a). Evaluation of the «*MELISA-TEK™* Ruminant kit» (ELISA technologies, Inc., Gainesville, FL, USA) for the detection of ruminant proteins in processed animal proteins. Second part based on a limited inter-laboratory study on the variability of the blank control. Report, February 2010, CRA-W, CRL-AP, Gembloux, Belgium. Disponible online en: [http://www.eurl.craw.eu/img/page/pcr/MELISATEK2\\_final.pdf](http://www.eurl.craw.eu/img/page/pcr/MELISATEK2_final.pdf).
- FUMIÈRE, O., MARIEN, A., FERNÁNDEZ PIERNA, J.A., BAETEN, V. y BERBEN, G. (2010b). Development of a real-time PCR protocol for the species origin confirmation of isolated animal particles detected by NIRM. **Food Additives and Contaminants** 27, 1118-1127.
- FUMIÈRE, O., MARIEN, A. y BERBEN, G. (2012a). Validation study of a real-time PCR method developed by TNO Triskelion bv for the detection of ruminant DNA in feedingstuffs. Preliminary Report, March 2012, CRA-W, EURL-AP, Gembloux, Belgium. Disponible online en: <http://eurl.craw.eu/img/article/20120309617d721b.pdf>.
- FUMIÈRE, O., MARIEN, A. y BERBEN, G. (2012b). EURL-AP PCR implementation test 2012. Final version. Report, May 2012, CRA-W, EURL-AP, Gembloux, Belgium. Disponible online en: [http://www.eurl.craw.eu/img/page/interlaboratory/EURL\\_AP\\_PCR\\_ILS\\_2012\\_final\\_version.pdf](http://www.eurl.craw.eu/img/page/interlaboratory/EURL_AP_PCR_ILS_2012_final_version.pdf).
- FUMIÈRE, O., MARIEN, A. y BERBEN, G. (2013). EURL-AP PCR proficiency test 2013. Final version. Report, May 2013, CRA-W, EURL-AP, Gembloux, Belgium. Disponible online en: <http://www.eurl.craw.eu/img/page/proficiency/EURL-AP%20PCR%20ILS%202013%20final%20version.pdf>.
- FUMIÈRE, O., MARIEN, A. y BERBEN, G. (2014). EURL-AP PCR proficiency test 2014. Final version. Report, September 2014, CRA-W, EURL-AP, Gembloux, Belgium. Disponible online en: [http://eurl.craw.eu/img/page/proficiency/EURL\\_AP\\_PCR\\_ILS\\_2014\\_final\\_version.pdf](http://eurl.craw.eu/img/page/proficiency/EURL_AP_PCR_ILS_2014_final_version.pdf).

## G

- GALIMBERTI, A., DE MATTIA, F., LOSA, A., BRUNI, I., FEDERICI, S., CASIRAGHI, M., MARTELOS, S. y LABRA, M. (2013). DNA barcoding as a new tool for food traceability. **Food Research International** 50, 55-63.
- GALIMBERTI, A., BRUNO, A., MEZZASALMA, V., DE MATTIA, F., BRUNI, I. y LABRA, M. (2015). Emerging DNA-based technologies to characterize food ecosystems. **Food Research International** 69, 424-433.
- GAO, H.-W., ZHANG, D.-B., PAN, A.-H., LIANG, W.-Q. y LIANG, C.-Z. (2003). Multiplex polymerase chain reaction method for detection of bovine materials in foodstuffs. **Journal of AOAC International** 86, 764-767.
- GAO, H.-W., XU, B.-L., LIANG, C.-Z., ZHANG, Y.-B. y ZHU, L.-H. (2004). Polymerase chain reaction method to detect canis materials by amplification of species-specific DNA fragment. **Journal of AOAC International** 87, 1195-1199.
- GARCÍA, R., AYALA, P.A. y PERDOMO, S.P. (2012). Epigenética: definición, bases moleculares e implicaciones en la salud y en la evolución humana. **Revista Ciencias de la Salud** 10, 59-71.
- GARRIDO-VARO, A., GUERRERO-GINEL, J.E. y GÓMEZ-CABRERA, A. (1993). Posibilidades y limitaciones de la aplicación de la técnica NIRS en la evaluación nutricional de alimentos para el ganado. En: Nuevas fuentes de alimentos para la producción animal IV. Cabrera, A.G., de Pedro Sauz, E.J. (Eds.). Junta de Andalucía, Consejería de Agricultura y Pesca, Sevilla, España, 243-255.
- GARRIDO-VARO, A. y FERNÁNDEZ, V. (1998). NIRS technology for the quantitative prediction of the percentage of meat-and-bone-meal added to a feed compound. A feasibility study. En: Report of the workshop on identification of animal ingredients in compound feeds focusing on the microscopic method for identification. Jørgensen, J.S. (Eds.). European Union, Committee of Experts of Methods Analysis (CEMA), Lyngby, Dinamarca, 9.
- GARRIDO-VARO, A., PÉREZ-MARÍN, M.D., GUERRERO-GINEL, J.E. y GÓMEZ-CABRERA, A. (2003). Avances en la utilización de la tecnología NIRS. Aplicaciones en producción animal. En: Avances en nutrición y alimentación animal. Rebollar, P.G., Mateos, G.G., de Blas, C. (Eds.). Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal (FEDNA), Madrid, España, 3-27.
- GARRIDO-VARO, A., PÉREZ-MARÍN, M.D., GUERRERO, J.E., GÓMEZ-CABRERA, A., DE LA HABA, M.J., BAUTISTA, J., SOLDADO, A., VICENTE, F., MARTÍNEZ, A., DE LA ROZA-DELGADO, B. y TERMES, S. (2005). Near infrared spectroscopy for enforcement of European legislation concerning the use of animal by-products in animal feeds. **Biotechnology, Agronomy, Society and Environment** 9, 3-9.
- GAŠPARIČ, M.B., TENGS, T., LA PAZ, J.L., HOLST-JENSEN, A., PLA, M., ESTEVE, T., ZEL, J. y GRUDEN, K. (2010). Comparison of nine different real-time PCR chemistries for qualitative and quantitative applications in GMO detection. **Analytical and Bioanalytical Chemistry** 396, 2023-2029.
- GHOVVATI, S., NASSIRI, M.R., MIRHOSEINI, S.Z., MOUSSAVI, A.H. y JAVADMANESH, A. (2009). Fraud identification in industrial meat products by multiplex PCR assay. **Food Control** 20, 696-699.
- GIRISH, P.S., ANJANEYULU, A.S.R., VISWAS, K.N., ANAND, M., RAJKUMAR, N., SHIVAKUMAR, B.M. y BHASKAR, S. (2004). Sequence analysis of mitochondrial 12S rRNA gene can identify meat species. **Meat Science** 66, 551-556.
- GIRISH, P.S., ANJANEYULU, A.S.R., NAGALEEKAR, V.K., HAUNSH, S., BHILEGAONKAR, K.N., AGGARWAL, R.K. y KONDAIAH, N. (2009). Poultry meat speciation by sequence analysis of mitochondrial 12S rRNA gene. **Indian Journal of Animal Sciences** 79, 217-220.
- GIZZI, G., VAN RAAMSDONK, L.W.D., BAETEN, V., MURRAY, I., BERBEN, G., BRAMBILLA, G. y VON HOLST, C. (2003a). An overview of tests for animal tissues in feeds applied in response to public health concerns regarding bovine spongiform encephalopathy. **Revue Scientifique et Technique-Office International des Epizooties** 22, 311-331.

- GIZZI, G., VON HOLST, C., BAETEN, V., BERBEN, G. y VAN RAAMSDONK, L.W.D. (2003b). Intercomparison study for the determination of processed animal proteins including meat and bone meal in animal feed. Joint Research Centre Institute for Reference Materials and Measurements (IRMM), Geel, Bélgica.
- GIZZI, G., VON HOLST, C., BAETEN, V., BERBEN, G. y VAN RAAMSDONK, L.W.D. (2004). Determination of processed animal proteins, including meat and bone meal, in animal feed. **Journal of AOAC Internacional** 87, 1334-1341.
- GÖTHERSTRÖM, A., COLLINS, M.J., ANGERBJÖRN, A. y LIDÉN, K. (2002). Bone preservation and DNA amplification. **Archaeometry** 44, 395-404.
- GOUT, S., VALDIVIA, H., MCDOWELL, D. y HARRIS, N. (2004). Detection of neuronal tissue in meat using tissue specific DNA modifications. **Biotechnology, Agronomy, Society and Environment** 8, 229-234.
- GRONER, B. (2002). Transcription factor regulation in mammary epithelial cells. **Domestic Animal Endocrinology** 23, 25-32.
- ## H
- HA, J.C., JUNG, W.T., NAM, Y.S. y MOON, T.W. (2006). PCR identification of ruminant tissue in raw and heat-treated meat meals. **Journal of Food Protection** 69, 2241-2247.
- HAJIBABAEI, M., SHOKRALLA, S., ZHOU, X., SINGER, G.A.C. y BAIRD, D.J. (2011). Environmental barcoding: a next-generation sequencing approach for biomonitoring applications using river benthos. **PLoS One** 6, e17497.
- HEFLE, S.L., JEANNITON, E. y TAYLOR, S.L. (2001). Development of a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of egg residues in processed foods. **Journal of Food Protection** 64, 1812-1816.
- HENNIGHAUSEN, L., ROBINSON, G.W., WAGNER, K.U. y LIU, X. (1997). Prolactin signaling in mammary gland development. **Journal of Biological Chemistry** 272, 7567-7569.
- HERRERO, B., MADRIÑÁN, M., VIEITES, J.M. y ESPIÑEIRA, M. (2010). Authentication of Atlantic cod (*Gadus morhua*) using real-time PCR. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 58, 4794-4799.
- HIGUCHI, R., FOCKLER, C., DOLLINGER, G. y WATSON, R. (1993). Kinetic PCR analysis: real-time monitoring DNA amplification reactions. **Biotechnology** 11, 1026-1030.
- HIRABAYASHI, K., SHIOTA, K. y YAGI, S. (2013). DNA methylation profile dynamics of tissue-dependent and differentially methylated regions during mouse brain development. **BMC Genomics** 14, 82.
- HIRD, H., GOODIER, R. y HILL, M. (2003). Rapid detection of chicken and turkey in heated meat products using the polymerase chain reaction followed by amplicon visualisation with vista green. **Meat Science** 65, 1117-1123.
- HIRD, H., CHISHOLM, J., SÁNCHEZ, A., HERNÁNDEZ, M., GOODIER, R., SCHNEEDE, K., BOLTZ, C. y POPPING, B. (2006). Effect of heat and pressure processing on DNA fragmentation and implications for the detection of meat using a real-time polymerase chain reaction. **Food Additives and Contaminants** 23, 645-650.
- HOLLAND, P.M., ABRAMSON, R.D., WATSON, R. y GELFAND, D.H. (1991). Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'→3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. **Proceeding of National Academy Sciences of the United States of America** 88, 7276-7280.
- HOPWOOD, A.J., FAIRBROTHER, K.S., LOCKLEY, A.K. y BARDSLEY, R.G. (1999). An actin gene-related polymerase chain reaction (PCR) test for identification of chicken in meat mixtures. **Meat Science** 53, 227-231.
- HOSSEINI, R., KELLER, M.A., SCHMIDT, O. y FRAMENAU, V.W. (2007). Molecular identification of wolf spiders (Araneae: Lycosidae) by multiplex polymerase chain reaction. **Biological Control** 40, 128-135.
- HOU, B., MENG, X., ZHANG, L., GUO, J., LI, S. y JIN, H. (2015). Development of a sensitive and specific multiplex PCR method for the simultaneous detection of chicken, duck and goose DNA in meat products. **Meat Science** 101, 90-94.

- HUBER, I., BLOCK, A., SEBAH, D., DEBODE, F., MORISSET, D., GROHMANN, L., BERBEN, G., STEBIH, D., MILAVEC, M., ZEL, J. y BUSCH, U. (2013). Development and validation of duplex, triplex, and pentaplex real-time PCR screening assays for the detection of genetically modified organisms in food and feed. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 61, 10293-10301.
- I**
- IFS (International Featured Standards) (2014). Norma para realizar auditorías de calidad y seguridad alimentaria de productos alimenticios, versión 6. Disponible online en: <http://www.ifs-certification.com/index.php/es/>.
- ILHAK, O.I. y ARSLAN, A. (2007). Identification of meat species by polymerase chain reaction (PCR) technique. **Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences** 31, 159-163.
- ILLINGWORTH, R.S. y BIRD, A.P. (2009). CpG islands - 'a rough guide'. **FEBS Letters** 583, 1713-1720.
- IMRAN, M. y MAHMOOD, S. (2011). An overview of animal prion diseases. **Virology Journal** 8, 493.
- INFANTE, C. y MANCHADO, M. (2006). Multiplex-polymerase chain reaction assay for the authentication of the mackerel *Scomber colias* in commercial canned products. **Journal of AOAC International** 89, 708-711.
- INFANTE, C., CRESPO, A., ZUASTI, E., PONCE, M., PÉREZ, L., FUNES, V., CATANESE, G. y MANCHADO, M. (2006). PCR-based methodology for the authentication of the Atlantic mackerel *Scomber scombrus* in commercial canned products. **Food Research Internacional** 39, 1023-1028.
- INGRAVALLE, F., ABETE, M.C., CRESCIO, M.I. y RU, G. (2007). Detection of animal-derived proteins in feedstuffs in Italy: a reproducible study. **Journal of Food Protection** 70, 986-990.
- INTERNATIONAL HUMAN GENOME CONSORTIUM (2004). Finishing the euchromatic sequence of the human genome. **Nature** 431, 931-945.
- IOJA-BOLDURA, O.M., POPESCU, S., BRUZNICAN, S. y HUTU, I. (2011). Applicability of a multiplex PCR assay for the identification of animal species in feedstuffs. **Bulletin UASVM Animal Science and Biotechnologies** 68, 179-185.
- ISO (International Organization for Standardization) (2011a). ISO 12875:2011 Traceability of finfish products-Specification on the information to be recorded in captured finfish distribution chains. Geneva: ISO.
- ISO (International Organization for Standardization) (2011b). ISO 12877:2011 Traceability of finfish products-Specification on the information to be recorded in farmed finfish distribution chains. Geneva: ISO.
- IWOBI, A.N., HUBER, I., HAUNER, G., MILLER, A. y BUSCH, U. (2011). Biochip technology for the detection of animal species in meat products. **Food Analytical Methods** 4, 389-398.
- J**
- JONKER, K.M., TILBURG, J.J.H.C., HÄGELE, G.H. y DE BOER, E. (2008). Species identification in meat products using real-time PCR. **Food Additives and Contaminants** 25, 527-533.
- JUSTÉ, A., THOMMA, B.P.H.J. y LIEVENS, B. (2008). Recent advances in molecular techniques to study microbial communities in food-associated matrices and processes. **Food Microbiology** 25, 745-761.
- K**
- KARABASANAVAR, N.S., SINGH, S.P., KUMAR, D. y SHEBANNAVAR, S.N. (2014). Detection of pork adulteration by highly-specific PCR assay of mitochondrial D-loop. **Food Chemistry** 145, 530-534.
- KARANAM, M. (2011). An improved protein extraction method for detecting ruminant material in feed using lateral flow device dipsticks. **Biotechnology, Agronomy, Society and Environment** 15, 25-29.
- KESMEN, Z., SAHIN, F. y YETIM, H. (2007). PCR assay for the identification of animal species in cooked sausages. **Meat Science** 77, 649-653.

- KESMEN, Z., GÜLLÜCE, A., SAHIN, F. y YETIM, H. (2009). Identification of meat species by TaqMan-based real-time PCR assay. **Meat Science** 82, 444-449.
- KESMEN, Z., YETIM, H. y SAHIN, F. (2010). Identification of different meat species used in sucuk production by PCR assay. **GIDA Dergisi** 35, 81-87.
- KESMEN, Z., YETIMAN, A.E., SAHIN, F. y YETIM, H. (2012). Detection of chicken and turkey meat in meat mixtures by using real-time PCR assays. **Journal of Food Science** 77, C167-C173.
- KESMEN, Z., CELEBI, Y., GÜLLÜCE, A. y YETIM, H. (2013). Detection of seagull meat in meat mixtures using real-time PCR analysis. **Food Control** 34, 47-49.
- KHRAPKO, K.R., LYSOV YU, P., KHORLYN, A.A., SHICK, V.V., FLORENTIEV, V.L. y MIRZABEKOV, A.D. (1989). An oligonucleotide hybridization approach to DNA sequencing. **FEBS Letters** 256, 118-122.
- KIM, S.-H., HUANG, T.-S., SEYMOUR, T.A., WEI, C.-I., KEMPF, S.C., BRIDGMAN, C.R., CLEMENS, R.A. y AN, H. (2004a). Identification of a biomarker for the detection of prohibited meat and bone meal residues in animal feed. **Journal of Food Science** 69, C739-C745.
- KIM, S.-H., HUANG, T.-S., SEYMOUR, T.A., WEI, C.-I., KEMPF, S.C., BRIDGMAN, C.R., CLEMENS, R.A. y AN, H. (2004b). Production of monoclonal antibody for the detection of meat and bone meal in animal feed. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 52, 7580-7585.
- KIM, S.-H., HUANG, T.-S., SEYMOUR, T.A., WEI, C.-I., KEMPF, S.C., BRIDGMAN, C.R., MOMCILOVIC, D., CLEMENS, R.A. y AN, H. (2005). Development of immunoassay for detection of meat and bone meal in animal feed. **Journal of Food Protection** 68, 1860-1865.
- KITPIPIT, T., SITTICHAN, K. y THANAKIATKRAI, P. (2014). Direct-multiplex PCR assay for meat species identification in food products. **Food Chemistry** 163, 77-82.
- KÖPPEL, R., RUF, J., ZIMMERLI, F. y BREITENMOSER, A. (2008). Multiplex real-time PCR for the detection and quantification of DNA from beef, pork, chicken and turkey. **European Food Research and Technology** 227, 1199-1203.
- KÖPPEL, R., ZIMMERLI, F. y BREITENMOSER, A. (2009). Heptaplex real-time PCR for the identification and quantification of DNA from beef, pork, chicken, turkey, horse meat, sheep (mutton) and goat. **European Food Research and Technology** 230, 125-133.
- KÖPPEL, R., RUF, J. y RENTSCH, J. (2011). Multiplex real-time PCR for the detection and quantification of DNA from beef, pork, horse and sheep. **European Food Research and Technology** 232, 151-155.
- KÖPPEL, R., DANIELS, M., FELDERER, N. y BRÜNEN-NIEWELER, C. (2013). Multiplex real-time PCR for the detection and quantification of DNA from duck, goose, chicken, turkey and pork. **European Food Research and Technology** 236, 1093-1098.
- KOTOWICZ, M., ADAMCZYK, E. y BANIA, J. (2007). Application of a duplex-PCR for detection of cows' milk in goats' milk. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine** 14, 215-218.
- KRCMÁR, P. y RENCOVÁ, E. (2001). Identification of bovine-specific DNA in feedstuffs. **Journal of Food Protection** 64, 117-119.
- KRCMÁR, P. y RENCOVÁ, E. (2003). Identification of species-specific DNA in feedstuffs. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 51, 7655-7658.
- KRCMÁR, P. y RENCOVÁ, E. (2005). Quantitative detection of species-specific DNA in feedstuffs and fish meals. **Journal of Food Protection** 68, 1217-1221.
- KREUZ, G., ZAGON, J., BROLL, H., BERNHARDT, C., LINKE, B. y LAMPEN, A. (2012). Immunological detection of osteocalcin in meat and bone meal: a novel heat stable marker for the investigation of illegal feed adulteration. **Food Additives and Contaminants** 29, 716-726.
- KUSAMA, T., NOMURA, T. y KADOWAKI, K. (2004). Development of primers for detection of meat and bone meal in ruminant feed and identification of the animal origin. **Journal of Food Protection** 67, 1289-1292.

KWIATEK, K., SIERADZKI, Z. y PRZENIOSŁO-SIWCZYŃSKA, M. (2005). Suitability of the FeedCheck test for the detection of processed animal protein in feedingstuffs. **Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy** 49, 65-68.

## L

- LAHIFF, S., GLENNON, M., O'BRIEN, L., LYNG, J., SMITH, T., MAHER, M. y SHILTON, N. (2001). Species-specific PCR for the identification of ovine, porcine and chicken species in meat and bone meal (MBM). **Molecular and Cellular Probes** 15, 27-35.
- LAHIFF, S., GLENNON, M., LYNG, J., SMITH, T., SHILTON, N. y MAHER, M. (2002). Real-time polymerase chain reaction detection of bovine DNA in meat and bone meal samples. **Journal of Food Protection** 65, 1158-1165.
- LAI, J., RU, G., INGRAVALLE, F., CHOISEUL, J., JØRGENSEN, J.S., PEÑA MILLAN, M.B., VANCUTSEM, J., WERNITZNIG, F., MARCHIS, D. y DECASTELLI, L. (2008). European interlaboratory trial regarding the official microscopic method for the detection of the presence of animal constituents in feedstuffs. **Journal of Food Protection** 71, 578-583.
- LAI, S.J., LIU, Y.P., LIU, Y.X., LI, X.W. y YAO, Y.G. (2006). Genetic diversity and origin Chinese cattle revealed by mtDNA D-loop sequence variation. **Molecular Phylogenetics and Evolution** 38, 146-154.
- LAUBE, I., ZAGON, J. y BROLL, H. (2007). Quantitative determination of commercially relevant species in foods by real-time PCR. **International Journal of Food Science and Technology** 42, 336-341.
- LEAL, M.C., PIMENTEL, T., RICARDO, F., ROSA, R. y CALADO, R. (2015). Seafood traceability: current needs, available tools, and biotechnological challenges for origin certification. **Trends in Biotechnology** 33, 331-336.
- LIU, L., CHEN, F.-C., DORSEY, J.L. y HSIEH, Y.-H.P. (2006). Sensitive monoclonal antibody-based sandwich ELISA for the detection of porcine skeletal muscle in meat and feed products. **Journal of Food Science** 71, M1-M6.
- LIU, X., HAN, L., VEYS, P., BAETEN, V., JIANG, X. y DARDENNE, P. (2011). An overview of the legislation and light microscopy for detection of processed animal proteins in feeds. **Microscopy Research and Technique** 74, 735-743.
- LÓPEZ-ANDREO, M., LUGO, L., GARRIDO-PERTIERRA, A., PRIETO, M.I. y PUYET, A. (2005). Identification and quantitation of species in complex DNA mixtures by real-time polymerase chain reaction. **Analytical Biochemistry** 339, 73-82.
- LÓPEZ-ANDREO, M. (2013). Identificación y cuantificación de especies en productos alimenticios mediante PCR en tiempo real. Tesis doctoral, Universidad Complutense de Madrid, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular IV. Disponible online en: <http://eprints.ucm.es/20096/>.
- LÓPEZ-CALLEJA, I., GONZÁLEZ, I., FAJARDO, V., MARTÍN, I., HERNÁNDEZ, P.E., GARCÍA, T. y MARTÍN, R. (2005a). Application of polymerase chain reaction to detect adulteration of sheep's milk with goats' milk. **Journal of Dairy Science** 88, 3115-3120.
- LÓPEZ-CALLEJA, I., GONZÁLEZ, I., FAJARDO, V., RODRÍGUEZ, M.A., HERNÁNDEZ, P.E., GARCÍA, T. y MARTÍN, R. (2005b). PCR detection of cows' milk in water buffalo milk and mozzarella cheese. **International Dairy Journal** 15, 1122-1129.
- LÓPEZ-CALLEJA, I., GONZÁLEZ, I., FAJARDO, V., MARTÍN, I., HERNÁNDEZ, P.E., GARCÍA, T. y MARTÍN, R. (2007a). Quantitative detection of goats' milk in sheep's milk by real-time PCR. **Food Control** 18, 1466-1473.
- LÓPEZ-CALLEJA, I., GONZÁLEZ, I., FAJARDO, V., MARTÍN, I., HERNÁNDEZ, P.E., GARCÍA, T. y MARTÍN, R. (2007b). Real-time TaqMan PCR for quantitative detection of cows' milk in ewes' milk mixtures. **International Dairy Journal** 17, 729-736.
- LÜ, C., CHEN, L., YANG, Z., LIU, X. y HAN, L. (2013). Visual recognition of fishmeal and meat and bone meal using temperature-dependent two-dimensional correlation near-infrared spectroscopy. **Applied Spectroscopy** 67, 1390-1394.
- LUND, M. y MADSEN, M. (2006). Strategies for the inclusion of an internal amplification control in conventional and real time PCR

detection of *Campylobacter* spp. in chicken fecal samples. **Molecular and Cellular Probes** 20, 92-99.

LV, X., LI, H., WANG, J., DONG, Y., LI, J. y QIN, Y. (2013). Quantification of fishmeal in compound feed using NIR spectroscopy. **Food Analytical Methods** 6, 906-914.

## M

MADI, T., BALAMURUGAN, K., BOMBARDI, R., DUNCAN, G. y MCCORD, B. (2012). The determination of tissue-specific DNA methylation patterns in forensic biofluids using bisulfite modification and pyrosequencing. **Electrophoresis** 33, 1736-1745.

MAGRAMA (Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente) (2012). Datos de producción de piensos 2012. Disponible online en: [http://aplicaciones.mapa.es/silum/silum\\_docs/novedades/5098/1.pdf](http://aplicaciones.mapa.es/silum/silum_docs/novedades/5098/1.pdf).

MAGRAMA (Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente) (2014). La situación de la gestión de los SANDACH y la alimentación animal centran el debate en ANAGRASA (Noticia). Disponible online en: <http://sandach.magrama.es/Publico/Noticias.aspx>.

MANE, B.G., MENDIRATTA, S.K. y TIWARI, A.K. (2009). Polymerase chain reaction assay for identification of chicken in meat and meat products. **Food Chemistry** 116, 806-810.

MAPA (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación) (2004). Diagnóstico y análisis estratégico del sector agroalimentario español. Análisis de la cadena de producción y distribución del sector de piensos. Disponible online en: [http://www.magrama.gob.es/es/alimentacion/temas/consumo-y-comercializacion-y-distribucion-alimentaria/informe\\_pensos\\_tcm7-7948.pdf](http://www.magrama.gob.es/es/alimentacion/temas/consumo-y-comercializacion-y-distribucion-alimentaria/informe_pensos_tcm7-7948.pdf).

MARCHIS, D., AMATO, G. y ABETE, M.C. (2013). A monitoring study of glyceroltriheptanoate (GTH) in animal by-products through a validated GC-MS analytical method. **Food Control** 34, 624-629.

MARGRY, R., VAN DEN HOVEN, S., GERRIS, C. y TARABA, B. (2005). Rapid analysis of meat and bone meal in feed. En: Rapid methods for biological and chemical contaminants in food and feed. Van Amerongen, A., Barug, D., Lauwaars, M. (Eds.). Wageningen Academic Publishers, Wageningen, Países Bajos, 193-205.

MARGULIES, M., EGHOLM, M., ALTMAN, W.E., ATTIYA, S., BADER, J.S., BEMBEN, L.A., BERKA, J., BRAVERMAN, M.S., CHEN, Y.J., CHEN, Z., DEWELL, S.B., DU, L., FIERRO, J.M., GOMES, X.V., GODWIN, B.C., HE, W., HELGESEN, S., HO, C.H., IRZYK, G.P., JANDO, S.C. y col. (2005). Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. **Nature** 437, 376-380.

MARTÍN, I., GARCÍA, T., FAJARDO, V., ROJAS, M., HERNÁNDEZ, P.E., GONZÁLEZ, I. y MARTÍN, R. (2008). Real-time PCR for quantitative detection of bovine tissues in food and feed. **Journal of Food Protection** 71, 564-572.

MARTÍN, I., GARCÍA, T., FAJARDO, V., ROJAS, M., HERNÁNDEZ, P.E., GONZÁLEZ, I. y MARTÍN, R. (2009a). Detection of horse DNA in food and feedstuffs using a polymerase chain reaction assay. **Journal of the Science of Food and Agriculture** 89, 1202-1206.

MARTÍN, I., GARCÍA, T., FAJARDO, V., ROJAS, M., PEGELS, N., HERNÁNDEZ, P.E., GONZÁLEZ, I. y MARTÍN, R. (2009b). Polymerase chain reaction detection of rabbit DNA in food and animal feed. **World Rabbit Science** 17, 27-34.

MARTÍN, I., GARCÍA, T., FAJARDO, V., ROJAS, M., PEGELS, N., HERNÁNDEZ, P.E., GONZÁLEZ, I. y MARTÍN, R. (2009c). SYBR-Green real-time PCR approach for the detection and quantification of pig DNA in feedstuffs. **Meat Science** 82, 252-259.

MARTÍN, I., GARCÍA, T., ROJAS, M., PEGELS, N., PAVÓN, M.A., HERNÁNDEZ, P.E., GONZÁLEZ, I. y MARTÍN, R. (2010). Real-time polymerase chain reaction detection of fishmeal in feedstuffs. **Journal of AOAC International** 93, 1768-1777.

MARTÍN, I. (2011). Desarrollo de técnicas genéticas de PCR y PCR en tiempo real para la detección de ADN de procedencia animal en piensos. Tesis doctoral, Universidad

- Complutense de Madrid, Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos.
- MATSUNAGA, T., CHIKUNI, K., TANABE, R., MUROYA, S., SHIBATA, K., YAMADA, J. y SHINMURA, Y. (1999). A quick and simple method for the identification of meat species and meat products by PCR assay. **Meat Science** 51, 143-148.
- MAUDET, C. y TABERLET, P. (2002). Holstein's milk detection in cheeses inferred from melanocortin receptor 1 (MC1R) gene polymorphism. **Journal of Dairy Science** 85, 707-715.
- MAYER, H.K. (2005). Milk species identification in cheese varieties using electrophoretic, chromatographic and PCR techniques. **International Dairy Journal** 15, 595-604.
- MAYER, W. y HOCHEGGER, R. (2011). Discrimination of two alleles of the melanocortin receptor 1 gene to discern European wild boar (*Sus scrofa scrofa*) and domestic pig (*Sus scrofa domestica*) in meat products by real-time PCR. **European Food Research and Technology** 232, 687-692.
- MENDOZA-ROMERO, L., VERKAAR, E.L.C., SAVELKOUL, P.H., CATSBURG, A., AARTS, H.J.M., BUNTJER, J.B. y LENSTRA, J.A. (2004). Real-time PCR detection of ruminant DNA. **Journal of Food Protection** 67, 550-554.
- METZKER, M.L., RAGHAVACHARI, R., RICHARDS, S., JACUTIN, S.E., CIVITELLO, A., BURGESS, K. y GIBBS, R.A. (1994). Termination of DNA synthesis by novel 3'-modified deoxyribonucleoside triphosphates. **Nucleic Acids Research** 22, 4259-4267.
- METZKER, M.L. (2010). Sequencing technologies - the next generation. **Nature Reviews. Genetics** 11, 31-46.
- MEYER, A. (1993). Evolution of mitochondrial DNA in fishes. En: Biochemistry and molecular biology of fishes. Hochachka, P.W. y Mommsen, T.P. (Eds.), Amsterdam, Holanda.
- MEYER, J., KOHNEN, A., HARF, R., FROESCHKE, G. y BRAND, R. (2006). Molecular markers for some small mammals of southern Africa. **Folia Zoologica** 55, 444-447.
- MEYER, R., HÖFELEIN, C., LÜTHY, J. y CANDRIAN, U. (1995). Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis: a simple method for species identification in food. **Journal of AOAC International** 78, 1542-1551.
- MEYER, R. y CANDRIAN, U. (1996). PCR-based DNA analysis for the identification and characterization of food components. **Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie** 29, 1-9.
- MORGAN, D.K. y WHITELAW, E. (2008). The case for transgenerational epigenetic inheritance in humans. **Mammalian Genome** 19, 394-397.
- MURRAY, I., AUCOTT, L.S. y PIKE, I.H. (2001). Use of discriminant analysis on visible and near infrared reflectance spectra to detect adulteration of fishmeal with meat and bone meal. **Journal of Near Infrared Spectroscopy** 9, 297-311.
- MYERS, M.J., FRIEDMAN, S.L., FARRELL, D.E., DOVE-PETTIT, D.A., BUCKER, M.F., KELLY, S., MADZO, S., CAMPBELL, W., WANG, R.-F., PAINE, D. y CERNIGLIA, C.E. (2001). Validation of a polymerase chain reaction method for the detection of rendered bovine-materials in feedstuffs. **Journal of Food Protection** 64, 564-566.
- MYERS, M.J., YANCY, H.F. y FARRELL, D.E. (2003). Characterization of a polymerase chain reaction-based approach for the simultaneous detection of multiple animal-derived materials in animal feed. **Journal of Food Protection** 66, 1085-1089.
- MYERS, M.J., FARRELL, D.E., HELLER, D.N. y YANCY, H.F. (2004). Development of a PCR-based method to identify species-specific components in dog food. **American Journal of Veterinary Research** 65, 99-103.
- MYERS, M.J., YANCY, H.F., FARRELL, D.E., WASHINGTON, J.D. y FROBISH, R.A. (2005). Evaluation of two commercial lateral-flow test kits for detection of animal proteins in animal feed. **Journal of Food Protection** 68, 2656-2664.
- MYERS, M.J., YANCY, H.F., ARANETA, M., ARMOUR, J., DERR, J., HOOSTELAERE, L.A.D., FARMER, D., JACKSON, F., KIESSLING, W.M., KOCH, H., LIN, H., LIU, Y., MOWLDS, G., PINERO, D., RITER, K.L., SEDWICK, J., SHEN, Y., WETHERINGTON, J. y



YOUNKINS, R. (2006). Validation of PCR-based method for the detection of various rendered materials in feedstuffs using a forensic DNA extraction kit. **Journal of Food Protection** 69, 205-210.

MYERS, M.J., YANCY, H.F., FARRELL, D.E., WASHINGTON, J.D., DEEVER, C.M. y FROBISH, R.A. (2007). Assessment of two enzyme-linked immunosorbent assay test marketed for detection of ruminant proteins in finished feed. **Journal of Food Protection** 70, 692-699.

MYERS, M.J., FARRELL, D.E., DEEVER, C.M., MASON, J., SWAIM, H.L. y YANCY, H.F. (2010). Detection of rendered meat and bone meals by PCR is dependent on animal species of origin and DNA extraction method. **Journal of Food Protection** 73, 1090-1096.

## N

NANSEN, C., HERRMAN, T. y SWANSON, R. (2010). Machine vision detection of bonemeal in animal feed samples. **Applied Spectroscopy** 64, 637-643.

NATONEK, M., SLOTA, E., ZYGA, A. y REJDUCH, B. (2004). The utilization of methods based on protein and DNA analysis for identification of animal-origin components in feeds. **Journal of Animal and Feed Sciences** 13, 75-78.

NATONEK-WISNIEWSKA, M. (2008). Validation of a method for identification of bovine meat-and-bone meal using PCR. **Annals of Animal Science** 8, 323-328.

NATONEK-WISNIEWSKA, M., KRZYSCIN, P. y PIESTRZYNSKA-KAJTOCH, A. (2013). The species identification of bovine, porcine, ovine and chicken components in animal meals, feeds and their ingredients, based on COX I analysis and ribosomal DNA sequences. **Food Control** 34, 69-78.

NESIC, K., SAMANC, H., VUJANAC, I., PRODANOVIC, R., NESIC, V., VELEBIT, B. y SAVIC, B. (2014). Detection of meat and bone meal in cattle feed and ruminal fluid - comparison and combining of microscopy and polymerase chain reaction. **Animal Feed Science and Technology** 187, 86-90.

## O

O'MAHONY, P.J. (2013). Finding horse meat in beef products - a global problem. **QJM: Monthly Journal of the Association of Physicians** 106, 595-597.

OIE (Organización Mundial de Sanidad Animal) (2014). Situación de la EEB en el mundo y tasa de incidencia anual. Disponible online en: <http://www.oie.int/es/sanidad-animal-en-el-mundo/datos-especificos-de-eeb/>.

ORTOLA-VIDAL, A., SCHNERR, H., ROJMYR, M., LYSHOLM, F. y KNIGHT, A. (2007). Quantitative identification of plant genera in food products using PCR and Pyrosequencing® technology. **Food Control** 18, 921-927.

## P

PANSIOT, J., CHAOUACHI, M., CAVELLINI, L., ROMANIUK, M., AYADI, M., BERTHEAU, Y. y LAVAL, V. (2011). Development of two screening duplex PCR assays for genetically modified organism quantification using multiplex real-time PCR master mixes. **European Food Research and Technology** 232, 327-334.

PARTIS, L., CROAN, D., GUO, Z., CLARK, R., COLDHAM, T. y MURBY, J. (2000). Evaluation of a DNA fingerprinting method for determining the species origin of meats. **Meat Science** 54, 369-376.

PASCOAL, A., PRADO, M., CALO, P., CEPEDA, A. y BARROS-VELÁZQUEZ, J. (2005). Detection of bovine DNA in raw and heat-processed foodstuffs, commercial foods and specific risk materials by a novel specific polymerase chain reaction method. **European Food Research and Technology** 220, 444-450.

PASCOAL, A., BARROS-VELÁZQUEZ, J., ORTEA, I., CEPEDA, A., GALLARDO, J.M. y CALO-MATA, P. (2011). Molecular identification of the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*), the white leg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) and the Indian white shrimp (*Fenneropenaeus indicus*) by PCR targeted to the 16S rRNA mtDNA. **Food Chemistry** 125, 1457-1461.

PAVINO, D., SQUADRONE, S., COCCHI, M., MARTRA, G., MARCHIS, D. y ABETE, M.C.

- (2010). Towards a routine application of vibrational spectroscopy to the detection of bone fragments in feedingstuffs: use and validation of a NIR scanning microscopy method. **Food Chemistry** 121, 826-831.
- PEGELS, N., GONZÁLEZ, I., FERNÁNDEZ, S., GARCÍA, T. y MARTÍN, R. (2012a) Sensitive detection of porcine DNA in processed animal proteins using TaqMan real-time PCR assay. **Food Additives and Contaminants** 29, 1402-1412.
- PEGELS, N., GONZÁLEZ, I., LÓPEZ-CALLEJA, I., FERNÁNDEZ, S., GARCÍA, T. y MARTÍN, R. (2012b). Evaluation of a TaqMan real-time PCR assay for detection of chicken, turkey, duck, and goose material in highly processed industrial feed samples. **Poultry Science** 91, 1709-1719.
- PEIRETTI, P.G. (2012). Effects of dietary fatty acids on lipid traits in the muscle and perirenal fat of growing rabbits fed mixed diets. **Animals** 2, 55-67.
- PEREIRA, F., CARNEIRO, J. y AMORIM, A. (2008). Identification of species with DNA-based technology: current progress and challenges. **Recent Patents on DNA & Gene Sequences** 2, 187-200.
- PÉREZ-MARÍN, D., GARRIDO-VARO, A., GUERRERO-GINEL, J.E. y GÓMEZ-CABRERA, A. (2004). Near-infrared reflectance spectroscopy (NIRS) for the mandatory labelling of compound feedingstuffs: chemical composition and open-declaration. **Animal Feed Science and Technology** 116, 333-349.
- PÉREZ-MARÍN, D., GARRIDO-VARO, A. y GUERRERO, J.E. (2005). Implementation of LOCAL algorithm with near-infrared spectroscopy for compliance assurance in compound feedingstuffs. **Applied Spectroscopy** 59, 69-77.
- PÉREZ-MARÍN, D.C., GARRIDO-VARO, A. y GUERRERO, J.E. (2006). Optimization of discriminant partial least squares regression models for the detection of animal by-product meals in compound feedingstuffs by near-infrared spectroscopy. **Applied Spectroscopy** 60, 1432-1437.
- PÉREZ-MARÍN, D.C., FEARN, T., GUERRERO, J.E. y GARRIDO-VARO, A. (2009). A methodology based on NIR-microscopy for the detection of animal protein by-products. **Talanta** 80, 48-53.
- PINHAL, D., GADIG, O.B.F., WASKO, A.P., OLIVEIRA, C., RON, E., FORESTI, F. y MARTINS, C. (2008). Discrimination of shark species by simple PCR of 5S rDNA repeats. **Genetics and Molecular Biology** 31, 361-365.
- PINOTTI, L., CAMPAGNOLI, A., MAGGIONI, L., PALTANIN, C., CHELI, F., DELL'ORTO, V. y SAVOINI, G. (2007). Selection of new markers for animal by-products characterization by classical microscopy. **Italian Journal of Animal Science** 6, 339-341.
- PIRAUX, F. y DARDENNE, P. (1999). Feed authentication by near-infrared microscopy. En: Proceeding of the 9<sup>th</sup> international conference on near-infrared spectroscopy. Davies, M.C., Giangiacomo, R. (Eds.). NIR Publications, Chichester, Inglaterra, 920.
- POSTOLLEC, F., FALENTIN, H., PAVAN, S., COMBRISSE, J. y SOHIER, D. (2011). Recent advances in quantitative PCR (qPCR) applications in food microbiology. **Food Microbiology** 28, 848-861.
- PRADO, M., BERBEN, G., FUMIÈRE, O., VAN DUIJN, G., MENSINGA-KRUIZE, J., REANEY, S., BOIX, A. y VON HOLST, C. (2007). Detection of ruminant meat and bone meals in animal feed by real-time polymerase chain reaction: result of an interlaboratory study. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 55, 7495-7501.
- PRADO, M., FUMIÈRE, O., BOIX, A., MARIEN, A., BERBEN, G. y VON HOLST, C. (2009). Novel approach for interlaboratory transfer of real-time PCR methods: detecting bovine meat and bone meal in feed. **Analytical and Bioanalytical Chemistry** 394, 1423-1431.
- PRADO, M., BOIX, A. y VON HOLST, C. (2012). Novel approach for the simultaneous detection of DNA from different fish species based on a nuclear target: quantification potential. **Analytical and Bioanalytical Chemistry** 403, 3041-3050.
- PRADO, M., BOIX, A. y VON HOLST, C. (2013). Development of a real-time PCR method for the simultaneous detection of mackerel

and horse mackerel. **Food Control** 34, 19-23.

## R

RASMUSSEN, R.S. y MORRISSEY, M.T. (2008). DNA-based methods for the identification of commercial fish and seafood species. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety** 7, 280-295.

RASMUSSEN, R.S., MORRISSEY, M.T. y HANNER, R.H. (2010). A multiplex PCR method for the identification of commercially important salmon and trout species (*Oncorhynchus* and *Salmo*) in North America. **Journal of Food Science** 75, C595-C606.

RASTOGI, G., DHARNE, M.S., WALUJKAR, S., KUMAR, A., PATOLE, M.S. y SHOUCHE, Y.S. (2007). Species identification and authentication of tissues of animal origin using mitochondrial and nuclear markers. **Meat Science** 76, 666-674.

RAYE, G., MIQUEL, C., COISSAC, E., REDJADJ, C., LOISON, A. y TABERLET, P. (2011). New insights on diet variability revealed by DNA barcoding and high-throughput pyrosequencing: chamois diet in autumn as a case study. **Ecological Research** 26, 265-276.

REAL DECRETO 578/2014, de 4 de julio de 2014, por el que se dictan disposiciones para la aplicación en España de la normativa de la Unión Europea relativa a la alimentación de animales de producción con determinados piensos de origen animal. **Boletín Oficial del Estado** núm. 165, de 8 de julio de 2014. Disponible online en: <https://www.boe.es/boe/dias/2014/07/08/pdfs/BOE-A-2014-7139.pdf>.

RECOMENDACIÓN 99/2013/UE de la Comisión, de 19 de febrero de 2013, sobre un plan coordinado de control para establecer la prevalencia de prácticas fraudulentas en la comercialización de determinados alimentos. **Diario Oficial de la Unión Europea** núm. L48, de 21 de febrero de 2013, 28-32. Disponible online en: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2013:048:0028:0032:ES:PDF>.

RECOMENDACIÓN 180/2014/UE de la Comisión, de 27 de marzo de 2014, sobre

un segundo plan coordinado de control para establecer la prevalencia de prácticas fraudulentas en la comercialización de determinados alimentos. **Diario Oficial de la Unión Europea** núm. L95, de 29 de marzo de 2014, 64-68. Disponible online en: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/HTML/?uri=CELEX:32014H0180&from=ES>.

REGLAMENTO 999/2001/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 22 de mayo de 2001, por el que se establecen disposiciones para la prevención, el control y la erradicación de determinadas encefalopatías espongiformes transmisibles. **Diario Oficial de las Comunidades Europeas** núm. L147, de 31 de mayo de 2001, 1-40. Disponible online en: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/PDF/?uri=CELEX:32001R0999&from=ES>.

REGLAMENTO 178/2002/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 28 de enero de 2002, por el que se establecen los principios y los requisitos generales de la legislación alimentaria, se crea la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria y se fijan procedimientos relativos a la seguridad alimentaria. **Diario Oficial de las Comunidades Europeas** núm. L31, de 1 de febrero de 2002, 1-24. Disponible online en: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2002:031:0001:0024:ES:PDF>.

REGLAMENTO 1774/2002/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 3 de octubre de 2002, por el que se establecen las normas sanitarias aplicables a los subproductos animales no destinados al consumo humano. **Diario Oficial de las Comunidades Europeas** núm. L273, de 10 de octubre de 2002, 1-95. Disponible online en: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/PDF/?uri=CELEX:32002R1774&from=ES>.

REGLAMENTO 1234/2003/CE de la Comisión, de 10 de julio de 2003, por el que se modifican los anexos I, IV y XI del Reglamento (CE) nº 999/2001 del Parlamento Europeo y del Consejo y el Reglamento (CE) nº 1326/2001 en lo que respecta a las encefalopatías espongiformes transmisibles y a la alimentación animal. **Diario Oficial de la**

**Unión Europea** núm. L173, de 11 de julio de 2003, 6-13. Disponible online en: <http://www.boe.es/doue/2003/173/L00006-00013.pdf>.

REGLAMENTO 1831/2003/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 22 de septiembre de 2003, sobre los aditivos en la alimentación animal. **Diario Oficial de la Unión Europea** núm. L268, de 18 de octubre de 2003, 29-43. Disponible online en: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/PDF/?uri=CELEX:32003R1831&from=ES>.

REGLAMENTO 852/2004/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 29 de abril de 2004, relativo a la higiene de los productos alimenticios. **Diario Oficial de la Unión Europea** núm. L226, de 25 de junio de 2004, 3-21. Disponible online en: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CONSLEG:2004R0852:20090420:ES:PDF>.

REGLAMENTO 853/2004/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 29 de abril de 2004, por el que se establecen normas específicas de higiene de los alimentos de origen animal. **Diario Oficial de la Unión Europea** núm. L226, de 25 de junio de 2004, 22-82. Disponible online en: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/PDF/?uri=CELEX:32004R0853R%2801%29&from=ES>.

REGLAMENTO 1292/2005/CE de la Comisión, de 5 de agosto de 2005, por el que se modifica el anexo IV del Reglamento (CE) nº 999/2001 del Parlamento Europeo y del Consejo en lo que respecta a la alimentación animal. **Diario Oficial de la Unión Europea** núm. L205, de 6 de agosto de 2005, 3-11. Disponible online en: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/PDF/?uri=CELEX:32005R1292&from=ES>.

REGLAMENTO 956/2008/CE de la Comisión, de 29 de septiembre de 2008, que modifica el anexo IV del Reglamento (CE) nº 999/2001 del Parlamento Europeo y del Consejo, por el que se establecen disposiciones para la prevención, el control y la erradicación de determinadas encefalopatías espongiformes transmisibles. **Diario Oficial de la Unión Europea** núm. L260, de 30 de septiembre de 2008, 8-11. Disponible

online en: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2008:260:0008:0011:ES:PDF>.

REGLAMENTO 152/2009/CE de la Comisión, de 27 de enero de 2009, por el que se establecen los métodos de muestreo y análisis para el control oficial de los piensos. **Diario Oficial de la Unión Europea** núm. L54, de 26 de febrero de 2009, 1-130. Disponible online en: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2009:054:0001:0130:ES:PDF>.

REGLAMENTO 163/2009/CE de la Comisión, de 26 de febrero de 2009, que modifica el anexo IV del Reglamento (CE) nº 999/2001 del Parlamento Europeo y del Consejo por el que se establecen disposiciones para la prevención, el control y la erradicación de determinadas encefalopatías espongiformes transmisibles. **Diario Oficial de la Unión Europea** núm. L55, de 27 de febrero de 2009, 17-18. Disponible online en: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2009:055:0017:0018:ES:PDF>.

REGLAMENTO 767/2009/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 13 de julio de 2009, sobre la comercialización y la utilización de los piensos, por el que se modifica el Reglamento (CE) nº 1831/2003 y se derogan las Directivas 79/373/CEE del Consejo, 80/511/CEE de la Comisión, 82/471/CEE del Consejo, 83/228/CEE del Consejo, 93/74/CEE del Consejo, 93/113/CE del Consejo y 96/25/CE del Consejo y la Decisión 2004/217/CE de la Comisión. **Diario Oficial de la Unión Europea** núm. L229, de 1 de septiembre de 2009, 1-28. Disponible online en: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2009:229:0001:0028:ES:PDF>.

REGLAMENTO 1069/2009/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 21 de octubre de 2009, por el que se establecen las normas sanitarias aplicables a los subproductos animales y los productos derivados no destinados al consumo humano y por el que se deroga el Reglamento (CE) nº 1774/2002 (Reglamento sobre subproductos animales). **Diario Oficial de la Unión Europea** núm. L300, de 14 de noviembre de 2009, 1-33. Disponible online en: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2009:300:0001:0033:ES:PDF>.

lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2009:300:0001:0033:ES:PDF.

REGLAMENTO 1224/2009/CE del Consejo, de 20 de noviembre de 2009, por el que se establece un régimen comunitario de control para garantizar el cumplimiento de las normas de la política pesquera común, se modifican los Reglamentos (CE) nº 847/96, (CE) nº 2371/2002, (CE) nº 811/2004, (CE) nº 768/2005, (CE) nº 2115/2005, (CE) nº 2166/2005, (CE) nº 388/2006, (CE) nº 509/2007, (CE) nº 676/2007, (CE) nº 1098/2007, (CE) nº 1300/2008 y (CE) nº 1342/2008 y se derogan los Reglamentos (CEE) nº 2847/93, (CE) nº 1627/94 y (CE) nº 1966/2006. **Diario Oficial de la Unión Europea** núm. L343, de 22 de diciembre de 2009, 1-50. Disponible online en: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2009:343:0001:0050:es:PDF>.

REGLAMENTO 142/2011/UE de la Comisión, de 25 de febrero de 2011, por el que se establecen las disposiciones de aplicación del Reglamento (CE) nº 1069/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo por el que se establecen las normas sanitarias aplicables a los subproductos animales y los productos derivados no destinados al consumo humano, y la Directiva 97/78/CE del Consejo en cuanto a determinadas muestras y unidades exentas de los controles veterinarios en la frontera en virtud de la misma. **Diario Oficial de la Unión Europea** núm. L54, de 26 de febrero de 2011, 1-254. Disponible online en: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2011:054:0001:0254:ES:PDF>.

REGLAMENTO 51/2013/CE de la Comisión, de 16 de enero de 2013, por el que se modifica el Reglamento (CE) nº 152/2009 en lo que respecta a los métodos de análisis para la determinación de componentes de origen animal con fines de control oficial de los piensos. **Diario Oficial de la Unión Europea** núm. L20, de 23 de enero de 2013, 33-43. Disponible online en: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2013:020:0033:0043:ES:PDF>.

REGLAMENTO 56/2013/UE de la Comisión, de 16 de enero de 2013, que modifica los anexos I y IV del Reglamento (CE) nº

999/2001 del Parlamento Europeo y del Consejo, por el que se establecen disposiciones para la prevención, el control y la erradicación de determinadas encefalopatías espongiformes transmisibles. **Diario Oficial de la Unión Europea** núm. L21, de 24 de enero de 2013, 3-16. Disponible online en: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2013:021:0003:0016:ES:PDF>.

REGLAMENTO 68/2013/UE de la Comisión, de 16 de enero de 2013, relativo al catálogo de materias primas para piensos. **Diario Oficial de la Unión Europea** núm. L29, de 30 de enero de 2013, 1-64. Disponible online en: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2013:029:0001:0064:ES:PDF>.

Reglamento 1379/2013/UE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 11 de diciembre de 2013, por el que se establece la organización común de mercados en el sector de los productos de la pesca y de la acuicultura, se modifican los Reglamentos (CE) nº 1184/2006 y (CE) nº 1224/2009 del Consejo y se deroga el Reglamento (CE) nº 104/2000 del Consejo. **Diario Oficial de la Unión Europea** núm. L354, de 28 de diciembre de 2013, 1-20. Disponible online en: <http://www.boe.es/doue/2013/354/L0001-00021.pdf>.

RENSSEN, G., SMITH, W., RUZANTE, J., SAWYER, M., OSBURN, B. y CULLOR, J. (2005). Development and evaluation of a real-time fluorescent polymerase chain reaction assay for the detection of bovine contaminants in cattle feed. **Foodborne Pathogens and Disease** 2, 152-159.

RENSSEN, G.J., SMITH, W.L., JARAVATA, C.V., OSBURN, B. y CULLOR, J.S. (2006). Development and evaluation of a real-time FRET probe based multiplex PCR assay for the detection of prohibited meat and bone meal in cattle feed and feed ingredients. **Foodborne Pathogens and Disease** 3, 337-346.

RESOLUCIÓN del Parlamento Europeo, de 8 de marzo de 2011, sobre el déficit de proteínas en la UE: búsqueda de soluciones para un antiguo problema (2010/2111(INI)). Textos aprobados, P7\_TA(2011)0084. Disponible online en:

- <http://www.europarl.europa.eu/sides/getDoc.do?pubRef=-//EP//NONSGML+REPORT+A7-2011-0026+0+DOC+PDF+V0//ES>.
- RICCIOLI, C., PÉREZ-MARÍN, D., GUERRERO-GINEL, J.E., SAEYS, W. y GARRIDO-VARO, A. (2011). Pixel selection for near-infrared chemical imaging (NIR-CI) discrimination between fish and terrestrial animal species in animal protein by-product meals. **Applied Spectroscopy** 65, 771-781.
- RICCIOLI, C. (2012). Detección y cuantificación de la especie en harinas proteicas de origen animal mediante el uso de sensores hiperspectrales. Tesis doctoral, Universidad de Córdoba, Departamento de Producción Animal. Disponible online en: <http://helvia.uco.es/xmlui/handle/10396/7036>.
- RIJNKELS, M., KABOTYANSKI, E., MONTAZER-TORBATI, M.B., BEAUVAIS, C.H., VASSETZKY, Y., ROSEN, J.M. y DEVINOY, E. (2010). The epigenetic landscape of mammary gland development and functional differentiation. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia** 15, 85-100.
- ROADMAP EPIGENOMICS CONSORTIUM (2015). Integrative analysis of 111 reference human epigenomes. **Nature** 518, 317-330.
- RODRÍGUEZ, M.A., GARCÍA, T., GONZÁLEZ, I., ASENSIO, L., MAYORAL, B., LÓPEZ-CALLEJA, I., HERNÁNDEZ, P.E. y MARTÍN, R. (2003). Development of a polymerase chain reaction assay for species identification of goose and mule duck in *foie gras* products. **Meat Science** 65, 1257-1263.
- RODRÍGUEZ, M.A., GARCÍA, T., GONZÁLEZ, I., ASENSIO, L., HERNÁNDEZ, P.E. y MARTÍN, R. (2004a). PCR identification of beef, sheep, goat and pork in raw and heat-treated meat mixtures. **Journal of Food Protection** 67, 172-177.
- RODRÍGUEZ, M.A., GARCÍA, T., GONZÁLEZ, I., ASENSIO, L., HERNÁNDEZ, P.E. y MARTÍN, R. (2004b). Quantitation of mule duck in goose *foie gras* using TaqMan real-time polymerase chain reaction. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 52, 1478-1483.
- ROJAS, M., GONZÁLEZ, I., PAVÓN, M.A., PEGELS, N., HERNÁNDEZ, P.E., GARCÍA, T. y MARTÍN, R. (2010a). Polymerase chain reaction assay for verifying the labeling of meat and commercial meat products from game birds targeting specific sequences from the mitochondrial D-loop region. **Poultry Science** 89, 1021-1032.
- ROJAS, M., GONZÁLEZ, I., PAVÓN, M.A., PEGELS, N., LAGO, A., HERNÁNDEZ, P.E., GARCÍA, T. y MARTÍN, R. (2010b). Novel TaqMan real-time polymerase chain reaction assay for verifying the authenticity of meat and commercial meat products from game birds. **Food Additives and Contaminants** 27, 749-763.
- ROJAS, M., GONZÁLEZ, I., DE LA CRUZ, S., HERNÁNDEZ, P.E., GARCÍA, T. y MARTÍN, R. (2011). Application of species-specific polymerase chain reaction assays to verify the labeling of quail (*Coturnix coturnix*), pheasant (*Phasianus colchicus*) and ostrich (*Struthio camelus*) in pet foods. **Animal Feed Science and Technology** 169, 128-133.
- RONAGHI, M., KARAMOHAMED, S., PETERSSON, B., UHLEN, M. y NYREN, P. (1996). Real-time DNA sequencing using detection of pyrophosphate release. **Analytical Biochemistry** 242, 84-89.
- RONAGHI, M., UHLEN, M. y NYREN, P. (1998). A sequencing method based on real-time pyrophosphate. **Science** 281, 363-365.
- RONAGHI, M. (2001). Pyrosequencing sheds light on DNA sequencing. **Genome Research** 11, 3-11.
- RUIJTER, J.M., LORENZ, P., TUOMI, J.M., HECKER, M. y VAN DEN HOFF, M.J.B. (2014). Fluorescent-increase kinetics of different fluorescent reporters used for qPCR depend on monitoring chemistry, targeted sequence, type of DNA input and PCR efficiency. **Mikrochimica Acta** 181, 1689-1696.
- RUSSO, V.E.A., MARTIENSSEN, R.A. y RIGGS, A.D. (1996). Epigenetic mechanisms of gene regulation. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

## S

- SAFDAR, M., JUNEJO, Y., ARMAN, K. y ABASIYANIK, M.F. (2014). Rapid bovine and caprine species identification in ruminant feeds by duplex real-time PCR melting curve analysis using EvaGreen fluorescence dye. **Molecular Biotechnology** 56, 770-776.
- SAFDAR, M. y JUNEJO, Y. (2015a). A multiplex-conventional PCR assay for bovine, ovine, caprine and fish species identification in feedstuffs: highly sensitive and specific. **Food Control** 50, 190-194.
- SAFDAR, M. y JUNEJO, Y. (2015b). Development and validation of fast duplex real-time PCR assays based on SYBER Green fluorescence for detection of bovine and poultry origins in feedstuffs. **Food Chemistry** 173, 660-664.
- SAFEED-PAP EU PROJECT Nº FOOD-CT-2006-036221 (2006-2009). Species-specific detection of processed animal proteins in animal feed. Disponible online en: <http://www.cra.wallonie.be/en/19/the-projects/216>.
- SÁNCHEZ DEL RIVERO, J.A., MONTAÑÉS-ROCES, E., DE LA ROZA-DELGADO, B., SOLDADO, A., LUACES, O., QUEVEDO, J.R. y BAHAMONDE, A. (2013). Feature selection for classification of animal feed ingredients from near infrared microscopy spectra. **Information Sciences** 241, 58-69.
- SÁNCHEZ, A., QUINTEIRO, J., REY-MÉNDEZ, M., PEREZ-MARTÍN, R.I. y SOTELO, C.G. (2009). Identification of European hake species (*Merluccius merluccius*) using real-time PCR. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 57, 3397-3403.
- SANGER, F., NICKLEN, S. y COULSON, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 74, 5463-5467.
- SANTACLARA, F.J., ESPIÑEIRA, M., CABADO, A.G. y VIEITES, J.M. (2007). Detection of land animal remains in fish meals by the polymerase chain reaction-restriction length polymorphism technique. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 55, 305-310.
- SANTOS, C.G., MELO, V.S., AMARAL, J.S., ESTEVINHO, L., OLIVEIRA, M.B.P.P. y MAFRA, I. (2012). Identification of hare meat by a species-specific marker of mitochondrial origin. **Meat Science** 90, 836-841.
- SEZAKI, K., ITOI, S. y WATABE, S. (2005). A simple method to distinguish two commercially valuable eel species in Japan *Anguilla japonica* and *A. anguilla* using polymerase chain reaction strategy with a species-specific primer. **Fisheries Science** 71, 414-421.
- SHINODA, N., KUSAMA, T., YOSHIDA, T., SUGIURA, T., KADOWAKI, K.-I., ONODERA, T. y SUGIURA, K. (2008). Developing PCR primers using a new computer program for detection of multiple animal-derived materials in feed. **Journal of Food Protection** 71, 2257-2262.
- SHINODA, N., TAKAGI, M., HAYAKAWA, T., ONODERA, T. y SUGIURA, K. (2010). Development of primers for detection of multiple cervid species in animal feed. **Journal of Food Safety** 30, 916-923.
- SHOKRALLA, S., ZHOU, X., JANZEN, D.H., HALLWACHS, W., LANDRY, J.F., JACOBUS, L.M. y HAJIBABAEI, M. (2011). Pyrosequencing for mini-barcoding of fresh and old museum specimens. **PLoS One** 6, e21252.
- SOARES, S., AMARAL, J.S., OLIVEIRA, M.B.P.P. y MAFRA, I. (2013). A SYBR Green real-time PCR assay to detect and quantify pork meat in processed poultry meat products. **Meat Science** 94, 115-120.
- SOLDADO, A., QUEVEDO, J.R., BAHAMONDE, A., MODROÑO, S., MARTINEZ-FERNANDEZ, A., VICENTE, F., PEREZ-MARIN, D., GARRIDO-VARO, A., GUERRERO, J.E. y DE LA ROZA-DELGADO, B. (2011). Validation of two discriminant strategies applied to NIRS data spectra for detection of animal meals in feedstuffs. **Spanish Journal of Agricultural Research** 9, 41-48.
- SONG, F., SMITH, J.F., KIMURA, M.T., MORROW, A.D., MATSUYAMA, T., NAGASE, H. y HELD, W.A. (2005). Association of tissue-specific differentially methylated regions (TDMs) with differential gene expression. **Proceedings of the National**

**Academy of Sciences of the United States of America** 102, 3336-3341.

STRATFEED EU PROJECT Nº G6RD-2000-CT-00414 (2001-2004). Strategies and methods to detect and quantify mammalian tissues in feedingstuffs. Disponible online en: <http://www.cra.wallonie.be/en/19/the-projects/61>.

## T

- TAJIMA, K., ENISHI, O., AMARI, M., MITSUMORI, M., KAJIKAWA, H., KURIHARA, M., YANAI, S., MATSUI, H., YASUE, H., MITSUHASHI, T., KAWASHIMA, T. y MATSUMOTO, M. (2002). PCR detection of DNAs of animal origin in feed by primers based on sequences of short and long interspersed repetitive elements. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry** 66, 2247-2250.
- TANABE, S., HASE, M., YANO, T., SATO, M., FUJIMURA, T. y AKIYAMA, H. (2007). A real-time quantitative PCR detection method for pork, chicken, beef, mutton and horseflesh in foods. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry** 71, 3131-3135.
- TARTAGLIA, M., SAULLE, E., PESTALOZZA, S., MORELLI, L., ANTONUCCI, G. y BATTAGLIA, P.A. (1998). Detection of bovine mitochondrial DNA in ruminant feeds: a molecular approach to test for the presence of bovine-derived materials. **Journal of Food Protection** 61, 513-518.
- TASARA, T., SCHUMACHER, S. y STEPHAN, R. (2005). Conventional and real-time PCR-based approaches for molecular detection and quantitation of bovine species material in edible gelatine. **Journal of Food Protection** 68, 2420-2426.
- TAVOLETTI, S., IOMMARINI, L. y PASQUINI, M. (2009). A DNA method for qualitative identification of plant raw materials in feedstuff. **European Food Research and Technology** 229, 475-484.
- TELETCHÉA, F., MAUDET, C. y HÄNNI, C. (2005). Food and forensic molecular identification: update and challenges. **Trends in Biotechnology** 23, 359-366.
- TELETCHÉA, F., BERNILLON, J., DUFFRAISE, M., LAUDET, V. y HÄNNI, C. (2008). Molecular identification of vertebrate species by oligonucleotide microarray in food and forensic samples. **Journal of Applied Ecology** 45, 967-975.
- TELETCHÉA, F. (2009). Molecular identification methods of fish species: reassessment and possible applications. **Reviews in Fish Biology and Fisheries** 19, 265-293.
- TENA, N., FERNÁNDEZ PIerna, J.A., BOIX, A., BAETEN, V. y VON HOLST, C. (2014). Differentiation of meat and bone meal from fishmeal by near-infrared spectroscopy: extension of scope to defatted samples. **Food Control** 43, 155-162.
- TETER, B., FINCH, C.E. y CONDORELLI, D.F. (1994a). DNA methylation in the glial fibrillary acidic protein gene: map of CpG methylation sites and summary of analysis by restriction enzymes and by LMPCR. **Journal of Neuroscience Research** 39, 708-709.
- TETER, B., OSTERBURG, H.H., ANDERSON, C.P. y FINCH, C.E. (1994b). Methylation of the rat glial fibrillary acidic protein gene shows tissue-specific domains. **Journal of Neuroscience Research** 39, 680-693.
- TOYODA, A., NAKAJO, M., KAWACHI, H., MATSUI, T. y YANO, H. (2004). PCR detection of bovine mitochondrial DNA derived from meat and bone meal in feed. **Journal of Food Protection** 67, 2829-2832.
- TSURUDA, S., SAKAMOTO, T., AKAKI, K. y HIWAKI, H. (2010). Detection of Pacific cod and capelin roes in Alaska pollack roe product by real-time PCR assay. **Food Hygiene and Safety Science** 51, 110-114.
- TURNBULL, J.L., ADAMS, H.N. y GORARD, D.A. (2015). Review article: the diagnosis and management of food allergy and food intolerances. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics** 41, 3-25.

## U

- UNSELD, M., BEYERMANN, B., BRANDT, P. y HIESEL, R. (1995). Identification of the species origin of highly processed meat products by mitochondrial DNA sequences. **PCR Methods and Applications** 4, 241-243.



## V

- VAN RAAMSDONK, L.W.D. y VAN DER VOET, H. (2003). A ring trial for the detection of animal tissues in feeds in the presence of fish meals. RIKILT, Wageningen, Países Bajos. Disponible online en: <http://edepot.wur.nl/34989>.
- VAN RAAMSDONK, L.W.D., VANCUTSEM, J., ZEGERS, J., FRICK, G., JORGENSEN, J.-S., PINCKAERS, V., BOSCH, J. y PARADIES-SEVERIN, I. (2004). The microscopic detection of animal proteins in feeds. **Biotechnology, Agronomy, Society and Environment** 8, 241-247.
- VAN RAAMSDONK, L.W.D., VON HOLST, C., BAETEN, V., BERBEN, G., BOIX, A. y DE JONG, J. (2007). New developments in the detection and identification of processed animal proteins in feeds. **Animal Feed Science and Technology** 133, 63-83.
- VAN RAAMSDONK, L.W.D., PINCKAERS, V.G.Z., HEKMAN, J.M., VLIEGE, J.J.M. y VAN RUTH, S.M. (2010). Animal proteins in feed. IAG ring test 2010. RIKILT, Wageningen, Países Bajos. Disponible online en: <http://edepot.wur.nl/161062>.
- VAN RAAMSDONK, L.W.D., PINCKAERS, V.G.Z., VLIEGE, J.J.M. y VAN RUTH, S.M. (2011). Animal proteins in feed. IAG ring test 2011. RIKILT, Wageningen, Países Bajos. Disponible online en: <http://edepot.wur.nl/188142>.
- VAN RAAMSDONK, L.W.D., PINCKAERS, V.G.Z. y VLIEGE, J.J.M. (2012). Animal proteins in feed. IAG ring test 2012. RIKILT, Wageningen, Países Bajos.
- VAN RAAMSDONK, L.W.D., PINCKAERS, V.G.Z., SCHOLTENS, I.M.J., PRINS, T.W. y VLIEGE, J.J.M. (2013). IAG ring test animal proteins 2013. RIKILT, Wageningen, Países Bajos. Disponible online en: <http://edepot.wur.nl/278923>.
- VANSELOW, J., YANG, W., HERRMANN, J., ZERBE, H., SCHUBERTH, H.J., PETZL, W., TOMEK, W. y SEYFERT, H.M. (2006). DNA-remethylation around a STAT5-binding enhancer in the alphaS1-casein promoter is associated with abrupt shutdown of alphaS1-casein synthesis during acute mastitis. **Journal of Molecular Endocrinology** 37, 463-477.
- VELASCO, A., SÁNCHEZ, A., MARTÍNEZ, I., SANTACLARA, F.J., PÉREZ-MARTÍN, R.I. y SOTELO, C.G. (2013). Development of a real-time PCR method for the identification of Atlantic mackerel (*Scomber scombrus*). **Food Chemistry** 141, 2006-2010.
- VEYS, P., BERBEN, G. y BAETEN, V. (2010). CRL-AP proficiency test 2009: final report. CRA-W, Gembloux, Bélgica. Disponible online en: [http://www.eurl.craw.eu/img/page/proficiency/CRL\\_AP\\_PT\\_2009\\_Final\\_report](http://www.eurl.craw.eu/img/page/proficiency/CRL_AP_PT_2009_Final_report).
- VEYS, P., BERBEN, G. y BAETEN, V. (2011). EURL-AP interlaboratory study microscopy 2010. Validation of a revised version of annex VI of EU Regulation EC/152/2009 and proficiency evaluation: final version. CRA-W, Gembloux, Bélgica. Disponible online en: [http://www.eurl.craw.eu/img/page/interlaboratory/EURL\\_AP\\_ILS\\_2010\\_final.pdf](http://www.eurl.craw.eu/img/page/interlaboratory/EURL_AP_ILS_2010_final.pdf).
- VEYS, P., BERBEN, G. y BAETEN, V. (2012). EURL-AP proficiency test microscopy 2011: final version. CRA-W, Gembloux, Bélgica. Disponible online en: <http://www.eurl.craw.eu/img/page/proficiency/EURL-AP%20PT%20microscopy%202012%20final.pdf>.
- VEYS, P. y BERBEN, G. (2013). EURL-AP proficiency test microscopy 2012: final version. CRA-W, Gembloux, Bélgica. Disponible online en: <http://www.eurl.craw.eu/img/page/proficiency/EURL-AP%20PT%20microscopy%202012%20final.pdf>.
- VEYS, P., BAETEN, V. y BERBEN, G. (2014). EURL-AP proficiency test microscopy 2013: final version. CRA-W, Gembloux, Bélgica. Disponible online en: <http://eurl.craw.eu/img/page/proficiency/EURL-AP%20PT%20microscopy%202013%20final.pdf>.
- VIDAKI, A., DANIEL, B. y COURT, D.S. (2013). Forensic DNA methylation profiling - potential opportunities and challenges. **Forensic Science International: Genetics** 7, 499-507.
- VON HOLST, C., VAN RAAMSDONK, L.W.D., BAETEN, V., STRATHMANN, S. y BOIX, A.

- (2004). The validation of the microscopic method selected in the Stratfeed project for detection of processed animal proteins in feed. Final report of the validation study of microscopic method. European Commission Directorate-General for Research (DG Research), Magazine on European Research (RTD info), Bruselas, Bélgica.
- VON HOLST, C., BAETEN, V., BOIX, A., SLOWIKOWSKI, B., FERNÁNDEZ PIERNA, J.A., TIRENDI, S. y DARDENNE, P. (2008). Transferability study of near-infrared microscopic method for the detection of banned meat and bone meals in feedingstuffs. **Analytical and Bioanalytical Chemistry** 392, 313-317.
- VON HOLST, C., BOIX, A., BELLORINI, S., SERANO, F., ANDRONI, S., VERKUYLEN, B. y MARGRY, R. (2009). Use of glyceroltriheptanoate as marker for processed animal by-products: development and validation of an analytical method. **Food Additives and Contaminants** 26, 466-474.
- VON HOLST, C., BOIX, A., MARIEN, A. y PRADO, M. (2012). Factors influencing the accuracy of measurements with real-time PCR: the example of the determination of processed animal proteins. **Food Control** 24, 142-147.
- ## W
- WADDINGTON, C.H. (1952). Selection of the genetic basis for an acquired character. **Nature** 169, 625-626.
- WANG, H.-C., LEE, S.-H., CHANG, T.-J. y WONG, M.-L. (2004). Examination of meat components in commercial dog and cat feed by using polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphisms (PCR-RFLPs) technique. **Journal of Veterinary Medical Science** 66, 855-859.
- WANG, R.-F., MYERS, M.J., CAMPBELL, W., CAO, W.-W., PAINE, D. y CERNIGLIA, C.E. (2000). A rapid method for PCR detection of bovine materials in animal feedstuffs. **Molecular and Cellular Probes** 14, 1-5.
- WANUNU, M. y MELLER, A. (2008). Single-molecule analysis of nucleic acids and DNA-protein interactions using nanopores. En: Single-molecule techniques: a laboratory manual (eds. Selvin, P. & Ha, T.J.), 395-420. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- WASSERSTROM, A., FRUMKIN, D., DAVIDSON, A., SHPITZEN, M., HERMAN, Y. y GAFNY, R. (2013). Demonstration of DSI-semen - a novel DNA methylation- based forensic semen identification assay. **Forensic Science International: Genetics** 7, 136-142.
- WEINER, A. y KWIATEK, K. (2008). Evaluation of the usefulness of PCR method for the detection of processed animal protein in feedingstuffs. **Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy** 52, 411-415.
- WILD, L.G. y LEHRER, S.B. (2005). Fish and shellfish allergy. **Current Allergy and Asthma Reports** 5, 74-79.
- WILHELM, J. y PINGOUD, A. (2003). Real-time polymerase chain reaction. **Chembiochem: a European Journal of Chemical Biology** 4, 1120-1128.
- WOLD, B. y MYERS, R.M. (2008). Sequence census methods for functional genomics. **Nature Methods** 5, 19-21.
- WOODGATE, S.L., VAN DEN HOVEN, S., VAESSEN, J. y MARGRY, R. (2009). Control tools to detect processed animal proteins in feed and in animal by-products: specificity and challenges. **Biotechnology, Agronomy, Society and Environment** 13, 9-13.
- ## X
- XU, W.T., BAI, W.B., LUO, Y.B., YUAN, Y., ZHANG, W., GUO, X. y HUANG, K. (2008). A novel common single primer multiplex polymerase chain reaction (CSP-M-PCR) method for the identification of animal species in minced meat. **Journal of the Science of Food and Agriculture** 88, 2631-2637.
- ## Y
- YANCY, H.F., WASHINGTON, J.D., CALLAHAN, L., MASON, J.A., DEEVER, C.M., FARRELL, D.E., HA, T., SESPICO, E., FALMLEN, D. y MYERS, M.J. (2009). Development, evaluation and peer verification of a rapid real-time PCR method for the detection of animal material. **Journal of Food Protection** 72, 2368-2374.

YANG, Z., HAN, L., FERNÁNDEZ PIERNA, J.A., DARDENNE, P. y BAETEN, V. (2011). The potential of near infrared microscopy to detect, identify and quantify processed animal by-products. **Journal of Near Infrared Spectroscopy** 19, 211-231.

YOSHIDA, T., NOMURA, T., SHINODA, N., KUSAMA, T., KADOWAKI, K. y SUGIURA, K. (2009). Development of PCR primers for the detection of porcine DNA in feed using mtATP6 as the target sequence. **Journal of the Food Hygienic Society of Japan** 50, 89-92.

YU-LEE, L.Y., LUO, G., BOOK, M.L. y MORRIS, S.M. (1998). Lactogenic hormone signal transduction. **Biology of Reproduction** 58, 295-301.

## Z

ZHANG, C.-L., FOWLER, M.R., SCOTT, N.W., LAWSON, G. y SLATER, A. (2007). A TaqMan real-time PCR system for the identification and quantification of bovine DNA in meats, milks and cheeses. **Food Control** 18, 1149-1158.

ZHOU, Q.C., ZHAO, J., LI, P., WANG, H.L. y WANG, L.G. (2011). Evaluation of poultry by-product meal in commercial diets for juvenile cobia (*Rachycentron canadum*). **Aquaculture** 322-323, 122-127.



## ***VIII. Glosario de Abreviaturas***





<b>2DCOS</b>	<i>Two-Dimensional Correlation Spectroscopy</i>	<b>DMRs</b>	<i>Differentially Methylated Regions</i>
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico	<b>DNA</b>	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
<b>ANFAAC</b>	Asociación Nacional de Fabricantes de Alimentos para Animales de Compañía	<b>dNTP</b>	<i>Deoxyribonucleotide triphosphate</i> Desoxirribonucleótido trifosfato
<b>ANN</b>	<i>Artificial Neural Network</i>	<b>DOCE</b>	Diario Oficial de las Comunidades Europeas
<b>ANOVA</b>	<i>Analysis of Variance</i> Análisis de la Varianza	<b>DOUE</b>	Diario Oficial de la Unión Europea
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico	<b>E</b>	<i>Efficiency</i> Eficiencia
<b>ARNr</b>	Ácido ribonucleico ribosómico	<b>EBI</b>	<i>European Bioinformatics Institute</i>
<b>BBQ</b>	<i>BlackBerry® Quencher</i>	<b>EC</b>	<i>European Commission</i>
<b>BLAST</b>	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>	<b>EDTA</b>	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i> Ácido etilendiaminotetraacético
<b>BOE</b>	Boletín Oficial del Estado	<b>EEB</b>	Encefalopatía Espongiforme Bovina
<b>bp</b>	<i>base pair</i>	<b>EETs</b>	Encefalopatías Espongiformes Transmisibles
<b>BRC</b>	<i>British Retail Consortium</i>	<b>EFPPRA</b>	<i>European Fat Processors and Renderers Association</i>
<b>BSE</b>	<i>Bovine Spongiform Encephalopathy</i> Encefalopatía Espongiforme Bovina	<b>EFSA</b>	<i>European Food Safety Authority</i> Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria
<b>CCMAS</b>	<i>Codex Committee on Methods of Analysis and Sampling</i>	<b>ELISA</b>	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
<b>CCPC</b>	Comité Científico de los Productos de Consumo	<b>EMBL</b>	<i>European Molecular Biology Laboratory</i>
<b>CE</b>	Comunidad Europea	<b>EMBOSS</b>	<i>European Molecular Biology Open Software Suite</i>
<b>CEE</b>	Comunidad Económica Europea	<b>ENGL</b>	<i>European Network of Genetically Modified Organism (GMO) Laboratories</i>
<b>COI</b>	<i>Cytochrome oxidase I</i> Citocromo oxidasa I	<b>EU</b>	<i>European Union</i> Unión Europea
<b>Cp</b>	<i>Crossing point</i> Punto de corte	<b>EURL-AP</b>	<i>European Union Reference Laboratory for Animal Proteins in feedingstuffs</i> Laboratorio Comunitario de Referencia para las Proteínas Animales en los piensos
<b>CRA-W</b>	<i>Centre Wallon de Recherches Agronomiques</i>	<b>FAO</b>	<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>
<b>CRT</b>	<i>Cyclic Reversible Termination</i>	<b>FDA</b>	<i>US Food and Drug Administration</i>
<b>Ct</b>	<i>Cycle threshold</i> Ciclo umbral	<b>FEDIAF</b>	Federación Europea de la Industria de Alimentos para Animales de Compañía
<b>DG SANCO</b>	<i>Directorate General for Health and Consumer Affairs</i>  Dirección General de Sanidad y Protección de los Consumidores		

<b>FEFAC</b>	<i>Federation Europeenne des Fabricants d'Aliments Composes pour Animaux</i> Federación Europea de Fabricantes de Piensos Compuestos	<b>IRMM</b>	<i>Institute for Reference Materials and Measurements</i>
<b>FIR</b>	<i>Far Infrared</i> Infrarrojo Lejano	<b>ISO</b>	<i>International Organization for Standardization</i> Organización Internacional para la Estandarización
<b>FRET</b>	<i>Fluorescence Resonance Energy Transfer</i> Transferencia de Energía de Resonancia Fluorescente	<b>kg</b>	kilogramo
<b>FSAI</b>	<i>Food Safety Authority of Ireland</i> Agencia Irlandesa de Seguridad Alimentaria	<b>KNN</b>	<i>K Nearest Neighbours</i>
<b>FT-NIR</b>	Reflectancia Infrarroja de Transformada de Fourier	<b>LDA</b>	<i>Linear Discriminant Algorithm</i>
<b>g</b>	gramo	<b>LFIA</b>	<i>Lateral-Flow Immunoassay</i>
<b>GC-FID</b>	<i>Gas Chromatography-Flame Ionization Detector</i> Cromatografía de Gases Acoplada a Detector de Ionización en Llama	<b>LNA</b>	<i>Locked Nucleic Acid</i>
<b>GC-MS</b>	<i>Gas Chromatography-Mass Spectrometry</i> Cromatografía de Gases Acoplada a Espectrometría de Masas	<b>LOD</b>	<i>Limit of Detection</i>
<b>GFAP</b>	<i>Glial Fibrillary Acidic Protein</i> Proteína Ácida Fibrilar Glial	<b>MAGRAMA</b>	Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente
<b>GFSI</b>	<i>Global Food Safety Initiative</i> Iniciativa Mundial de Seguridad Alimentaria	<b>MALDI-TOF-MS</b>	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry</i> Desabsorción/Ionización Láser Asistida por Matriz
<b>GHR</b>	<i>Growth Hormone Receptor</i>	<b>MAPA</b>	Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación
<b>GMO</b>	<i>Genetically Modified Organism</i>	<b>MBM</b>	<i>Meat and Bone Meal</i>
<b>GTH</b>	Triheptanoato de glicerol	<b>MC1R</b>	<i>Melanocortin 1 receptor</i> Receptor 1 de la Melanocortina
<b>IAG</b>	<i>International Association for Feedingstuff Analysis</i> Asociación Internacional para el Análisis de Piensos	<b>mg</b>	miligramo
<b>IFIF</b>	<i>International Feed Industry Federation</i>	<b>MGB</b>	<i>Minor Groove Binder</i>
<b>IFS</b>	<i>International Featured Standards</i>	<b>min</b>	minuto
<b>IHCP</b>	<i>Institute for Health and Consumer Protection</i>	<b>MIR</b>	<i>Middle Infrared</i> Infrarrojo Medio
<b>INIA</b>	Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria	<b>mL</b>	mililitro
<b>IR</b>	<i>Infrared</i> Infrarrojo	<b>MPLS</b>	<i>Modified Partial Least Squares</i>
		<b>MPS</b>	<i>Massive Parallel Sequencing</i> Secuenciación Masiva en Paralelo
		<b>MS</b>	<i>Mass Spectrometry</i> Espectrometría de Masas
		<b>mtDNA</b>	<i>Mitochondrial deoxyribonucleic acid</i>



<b>NCBI</b>	<i>National Centre for Biotechnology Information</i>	<b>RNA</b>	<i>Ribonucleic acid</i>
<b>NFQ</b>	<i>Non Fluorescent Quenchers</i> <i>Quencher No Fluorescente</i>	<b>rRNA</b>	<i>Ribosomal ribonucleic acid</i>
<b>ng</b>	nanogramo	<b>RSDr</b>	<i>Relative Repeatability Standard Deviation</i>
<b>NGS</b>	<i>Next Generation Sequencing</i>	<b>SAFEED-PAP</b>	<i>Species-specific Detection of Processed Animal Proteins in Animal Feed</i>
<b>NIR</b>	<i>Near Infrared</i> <i>Infrarrojo Cercano</i>	<b>SBL</b>	<i>Sequencing By Ligation</i>
<b>NIR-CI</b>	<i>Near Infrared-Chemical Imaging</i> <i>NIR-imagen</i>	<b>SD</b>	<i>Standard Deviation</i> <i>Desviación Estándar</i>
<b>NIRM</b>	<i>Near Infrared Microscopy</i> <i>Microscopía-NIRS</i>	<b>SIMCA</b>	<i>Soft Independent Modeling of Class Analogy</i>
<b>NIRS</b>	<i>Near Infrared Spectroscopy</i> <i>Espectroscopia de Infrarrojo Cercano</i>	<b>SNP</b>	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i> <i>Polimorfismo de Nucleótido Simple</i>
<b>nm</b>	nanómetro	<b>STAT</b>	<i>Signal Transducers and Activators of Transcription</i>
<b>OIE</b>	World Organisation for Animal Health <i>Organización Mundial de Sanidad Animal</i>	<b>STRATFEED</b>	<i>Strategies and Methods to Detect and Quantify Mammalian Tissues in Feedingstuffs</i>
<b>OMGs</b>	Organismos Modificados Genéticamente	<b>SVM</b>	<i>Support Vector Machines</i>
<b>PAPs</b>	<i>Processed Animal Proteins</i>	<b>t</b>	Tonelada métrica
<b>pb</b>	pares de bases	<b>Taq</b>	<i>Thermus aquaticus</i>
<b>PCA</b>	<i>Principal Component Analysis</i> <i>Análisis de Componentes Principales</i>	<b>TBE</b>	Tetrabromoetileno
<b>PCR</b>	<i>Polymerase Chain Reaction</i> <i>Reacción en Cadena de la Polimerasa</i>	<b>TCE</b>	Tetracloroetileno
<b>PCR-RFLP</b>	<i>PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism</i> <i>Polimorfismo en la Longitud de los Fragmentos de Restricción de Regiones Amplificadas por PCR</i>	<b>TNO</b>	<i>Netherlands Organisation for Applied Scientific Research</i>
<b>pg</b>	picogramo	<b>TSEs</b>	<i>Transmissible Spongiform Encephalopathies</i>
<b>PLS</b>	<i>Partial Least Squares</i>	<b>UE</b>	Unión Europea
<b>pmol</b>	picomol	<b>USA</b>	<i>United States of America</i> <i>Estados Unidos de América</i>
<b>PNT</b>	Procedimientos Normalizados de Trabajo	<b>VLA</b>	<i>Veterinary Laboratories Agency</i>
<b>Q-TOF-MS</b>	<i>Quadrupole Time-Of-Flight Mass Spectrometry</i> <i>Espectrometría de Masas de Cuadrupolo Tiempo de Vuelo</i>	<b>μL</b>	Microlitro

